

**Molekularbiologische Analyse von  
*Dornröschen* und *Dornröschen-like***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Bianca Jacobs**

aus Duisburg

Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Werr  
(Gutachter) Prof. Dr. Siegfried Roth

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2011

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Das sprossapikale Meristem .....	1
1.1.1 Aufbau des Sprossapikalmeristems.....	1
1.1.2 Spezifizierung und Aufrechterhaltung des SAM .....	3
1.1.3 Phyllotaxis .....	5
1.1.4 Aufbau und Entwicklung der <i>Arabidopsis</i> Blüte .....	7
1.2 Die AP2-Familie .....	9
1.3 <i>Dornröschen</i> und <i>Dornröschen-like</i> .....	12
1.4 Zielsetzung der Arbeit .....	14
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>15</b>
2.1 Material.....	15
2.1.1 Bakterienstämme .....	15
2.1.2 Klonierungs- und Expressionsvektoren.....	15
2.1.3 Verwendete Desoxyoligonukleotide .....	15
2.2 Methoden .....	17
2.2.1 Nicht-radioaktive RNA <i>In situ</i> Hybridisierung ( <i>ISH</i> ) .....	17
2.2.2 Klonierung der Chimären .....	17
2.2.3 Proteinsynthese und Aufreinigung .....	18
2.2.4 <i>EMSA</i> und <i>CASTing</i> .....	18
2.3 Erzeugte Klone und transgene Pflanzenlinien .....	19
2.3.1 <i>DRNL</i> Reporter-gen-Linien in pGPTV.....	19
2.3.2 Konstrukte zur <i>in vitro</i> Proteinexpression in pIVEX 2.5d/2.6d .....	19
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>21</b>
3.1 Expression von <i>Dornröschen-like</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	21
3.1.1 <i>DRNL</i> wird während der gesamten Embryogenese exprimiert.....	21
3.1.2 <i>DRNL</i> wird während der Organogenese von Blättern exprimiert.....	24
3.1.3 <i>DRNL</i> markiert alle Organanlagen in der Blüte.....	25
3.1.4 <i>DRNL</i> und <i>DRN</i> besitzen teilweise überlappende Expressionsdomänen.....	31
3.1.5 Lokalen Auxin-Maxima erscheinen in floralen Organanlagen zeitlich versetzt im Vergleich zur <i>DRNL</i> -Expression .....	34
3.2 DNA-Bindestudien mit <i>DRN</i> und <i>DRNL</i> .....	37
3.2.1 <i>DRN</i> und <i>DRNL</i> zeigten im <i>EMSA</i> keine spezifische Bindung an die GCC- Box .....	38
3.2.2 Interaktion von <i>DRN</i> und <i>DRNL</i> mit alternative Motiven .....	43

3.2.3	DNA-Bindestudien von DRN/DRNL-DREB1A-Chimären .....	44
3.3	Die Identifizierung DRNL regulierter Gene via <i>microarray</i> .....	46
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>56</b>
4.1	DRNL markiert die Gründerzellen lateraler Organe .....	56
4.1.1	Die Bildung lateraler Organanlagen aus dem embryonalen und vegetativen SAM erfolgt nach dem selben Muster.....	57
4.1.2	Die Entstehung floraler Organe unterliegt verschiedenen Musterbildungsprozessen .....	57
4.2	Die partielle Redundanz von DRN und DRNL ist hauptsächlich begründet in funktionaler Equivalenz und überlappenden Expressionsdomänen .....	62
4.3	Die frühe Regulation von <i>DRNL</i> erfolgt unabhängig von Auxin .....	65
4.4	Die Funktion von DRN und DRNL als mögliche Transkriptionsfaktoren.....	68
4.5	Die transkriptionelle Kontrolle durch DRNL und DRN.....	72
	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>76</b>
	<b>Abstract .....</b>	<b>77</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>85</b>

## Abkürzungen

AS	Aminosäure
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>AuxREs</i>	‚Auxin-Responsive Elements‘
bp	Basenpaare
c-terminal	Carboxy-terminal
<i>CASTing</i>	‚Cyclic Amplification and Selection of Targets‘
CFP	‚Cyan Fluorescent Protein‘
<i>ChIP</i>	‚Chromatin Immunoprecipitation‘
cM	centi Morgan
DNA	Desoxyribonucleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>EMSA</i>	<i>Electrophoresis Mobility Shift Assay</i>
GFP	‚Green Fluorescent Protein‘
FM	Florales Meristem
h	Stunde
IAA	indole-3-acetic acid (Indol-3-essigsäure)
IM	Infloreszenzmeristem
IP	Immunoprecipitation
<i>ISH</i>	‚in situ Hybridisierung‘
kb	Kilobasen
n-terminal	Amino-terminal
<i>Nt</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
ORF	‚Open Reading frame‘ (offenes Leseraster)
PCR	‚Polymerase Chain Reaction‘
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
SAM	Sproßapikalmeristem
t	Tag
TAE	Tris/Actat/EDTA Puffer
TAIR	<i>The Arabidopsis Information Resource</i>
TBE	Puffer Tris/Borat/EDTA
TF	Transkriptionsfaktor
WT	Wildtyp

# 1 Einleitung

## 1.1 Das sprossapikale Meristem

Im Verlauf ihrer gesamten post-embryonalen Entwicklung bilden Pflanzen kontinuierlich laterale Organe, die in der Peripherie der Stammzellzone entstehen. Das Sprossapikalmeristem (SAM) besteht aus einer Population pluripotenter Stammzellen, die neben der Produktion lateraler Pflanzenorgane außerdem zur Formation der Sprossachse beitragen (Steeves T.A. and Sussex, 1989).

### 1.1.1 Aufbau des Sprossapikalmeristems

Das SAM besteht aus einer kleinen Gruppe undifferenzierter Zellen an der apikalen Spitze des Sprosses, wo es zentral zwischen den beiden Keimblättern lokalisiert ist (Cutter, 1965). Aus dem SAM entsteht der gesamte oberirdische Teil der Pflanze, abgesehen von Hypokotyl und Keimblättern (Sussex, 1989). Das SAM erfüllt eine Reihe von verschiedenen Funktionen, wie die Bildung von Gewebe und die Initiierung von Organen, aber auch die Kommunikation mit anderen Teilen der Pflanze. Nicht zuletzt muss die eigene Aufrechterhaltung als funktionale Region reguliert werden (Sachs, 1991; Medford, 1992).

Bereits während der Embryogenese zwischen Herz- und Torpedostadium, ist eine Region in der apikalen Hemisphäre des sich entwickelnden Embryos, bestehend aus drei separaten Zellschichten, erkennbar. Diese Zellschichten sind die Vorläufer der beiden Tunikaschichten (L1 und L2) und des Korpus (L3) (Barton and Poethig, 1993). Das vegetative SAM von *Arabidopsis* besitzt, den für zweikeimblättrige Pflanzen typischen dreischichtigen Aufbau (Satina, 1940; Vaughan, 1952, 1955). Die L1 Schicht bildet die äußere Zellschicht an der Spitze des Apex und teilt sich nur antiklin, wobei sie die Epidermis bildet (Vaughan, 1955). Zusammen mit der darunterliegenden L2 Schicht bildet sie die Tunika. Die L2 teilt sich zunächst antiklin, dadurch werden Tochterzellen in der selber Schicht wie ihre Mutterzelle gehalten und die Tunika bleibt separiert vom Korpus. Zu einem späteren Stadium, während der Initiierung von Organprimordien, zeigt die L2 Schicht, neben antikliner, auch perikline Zellteilung (Vaughan, 1955). Die darunterliegenden Zellen der L3 Schicht bilden den sogenannten Korpus, aus welchem das Grundgewebe und vaskuläre System entsteht (Brand et al., 2001). Dabei teilen sich diese ungerichtet (antiklin und periklin). Alle Schichten sind beteiligt an der Entstehung von Blüten und Blättern, so dass die Epidermis adulter Organe aus Zellen der L1 hervorgeht, subepidermale Zellen von der L2 abstammen, und zentrale Zellen von der L3 (Lenhard and Laux, 1999; Weigel and Jurgens, 2002). Nach dem Eintritt in die vegeta-

tive Phase wird das SAM außerdem in verschiedene Zonen unterteilt, die sich bezüglich Zellgröße und Teilungsrate unterscheiden (Vaughan, 1955; Miksche, 1965). Die zentrale Mutterzellzone wird von einer kleinen Population aus pluripotenten Zellen mit geringer Zellteilungsrate gebildet, die als Stammzellreservoir dienen. Umgeben wird sie von der peripheren Zone, die aus kleinen, sich schnell teilenden und differenzierenden Zellen besteht. Die Differenz der Zellteilungsrate beider Zonen variiert zwischen verschiedenen Spezies. In *Rudbeckia* ist die Generationszeit von Zellen in der Peripherie, im Vergleich zu der zentralen Zone, um das 1,6 fache erhöht, in *Oryza* um den Faktor 7,8 (Lyndon, 1998). In der Peripherie werden regelmäßig Primordien initiiert, die zu lateralen Organen differenzieren, oder im Laufe der weiteren Entwicklung sekundäre Meristeme bilden. Darunter liegen die Markzellen, die sich ebenfalls häufig teilen, und den Spross bilden (Steeves T.A. and Sussex, 1989).

Während der vegetativen Wachstumsphase werden vom SAM regelmäßig neue Blätter initiiert, in deren Achseln sekundäre Meristeme entstehen, welche in Verhalten und Struktur denen des primären SAM entsprechen, und die zu Seitentrieben auswachsen (Meyerowitz, 1997). Zu Beginn der reproduktiven Phase verändert sich die Form des SAM von leicht konvex in der vegetativen Wachstumsphase, zu einer deutlich hügel-förmigen Struktur des IMs, wobei die Organisation in verschiedene Schichten und Zonen bestehen bleibt (Vaughan, 1955; Miksche, 1965). Nach der Blühinduktion stoppt das SAM die Produktion von Blättern und beginnt stattdessen als Infloreszenzmeristem Blütenprimordien oder florale Meristeme zu initiieren. Bereits angelegte Blattprimordien werden zu Hochblättern, in deren Achseln sich weitere Infloreszenzen bilden (Hempel and Feldman, 1995). Blüten hingegen besitzen rudimentäre Tragblätter, welche in der Peripherie des IM initiiert werden, bevor in ihren Achseln neue FM's entstehen (Long and Barton, 2000; Hepworth et al., 2006; Kwiatkowska, 2006). Unmittelbar nach der Initialisierung eines FM's beginnen sich die Zellen schnell und koordiniert in alle Richtungen zu teilen und auszubreiten, wobei im Zentrum eine Gruppe von Zellen generiert wird, aus denen alle Blütenorgane gebildet werden (Bossinger and Smyth, 1996; Reddy et al., 2004; Kwiatkowska, 2006).

Die Regulation der Zellteilung beruht anscheinend in frühen und späten Stadien der Blütenentwicklung auf verschiedenen Mechanismen (Jenik and Irish, 2000). Zu Beginn der Entwicklung teilt sich das FM in vier konzentrische Ringe, und Zellteilungsmuster sind abhängig von der radialen Position der Zelle innerhalb des FM's, nicht von den einzelnen Organen, die in dem jeweiligen Ring entstehen. Ab Stadium 6 der Organogenese wird die Zellteilung und -differenzierung dann weitestgehend durch die homöotischen ABC-Gene kontrolliert. Dadurch wird die Ringstruktur aufgebrochen und es entwickeln sich individuelle Organprimordien innerhalb jeden Wirtels. Gleichzeitig kommt es zur Subdifferenzierung der Zellen, die innerhalb der entstehenden Organe unterschiedliche Identitäten einnehmen (Jenik and Irish, 2000). Jedes Organprimordium entsteht aus ei-

ner Gruppe von Zellen, die durch eine Grenzregion von einander separiert sind, in der sich die Zellen nur selten teilen (Breuil-Broyer et al., 2004). Zum Ende der Blütenentwicklung, nachdem alle Organe herangereift sind, ist das Stammzellreservoir des FMs völlig aufgebraucht (Takeda et al., 2004; Krizek and Fletcher, 2005).

Die Bildung lateraler Organe lässt sich in drei Phasen unterteilen. Zunächst werden Gründerzellen aus dem IM rekrutiert, die durch kontrollierte Zellteilung eine Organanlage bilden, welche letztlich im Verlauf der Organogenese zu einem histologisch erkennbarem Primordium auswachsen (Beveridge et al., 2007). Durch eine Kombination von histologischer und klonaler Analyse konnte das SAM und die Bildung von Organprimordien bereits detailliert charakterisiert werden (Irish, 1992). Durch klonale Sektoranalyse konnte die Anzahl von Zellen der L2-Schicht bestimmt werden, die zur Entstehung eines Blattprimordiums benötigt werden. Es wurde nachgewiesen, dass die ersten beiden echten Blätter aus jeweils 8-9 Zellen entstehen, Blatt 3-6 aus 3-4 und die folgenden, sowie die Infloreszenz aus 1-2 Zellen (Irish, 1992). FMs werden aus einem Block von vier Gründerzellen initialisiert, Sepalen und Karpelle aus acht, Stamen aus vier und die Petalen aus zwei Zellen (Bossinger and Smyth, 1996).

### 1.1.2 Spezifizierung und Aufrechterhaltung des SAM

Entscheidend für die Etablierung und Aufrechterhaltung eines aktiven Meristems ist die Balance, zwischen einer gleichbleibenden Stammzellpopulation im Zentrum und Zellen mit einer hohen Zellteilungsrate und Differenzierung in der Peripherie, die abhängig ist von einem durch *WUSCHEL* (*WUS*) regulierten Mechanismus (Laux et al., 1996; Sablowski, 2007). Das Homeobox-Protein *WUS* kontrolliert die Stammzellidentität in der zentralen Zone des SAM, der *wus* Mutante fehlen Stammzellen im SAM (Mayer et al., 1998). *WUS* wird in einer kleinen Zellpopulation direkt unterhalb der Stammzellzone exprimiert, aber nicht in den Stammzellen selbst. Die Regulation erfolgt über ein Rezeptor-Kinase-Signalsystem, in das *CLAVATA1*, 2 und 3 (*CLV1,2,3*) involviert sind (Mayer et al., 1998; Brand et al., 2000; Schoof et al., 2000).

Ein weiterer wichtiger Faktor für die positive Regulation des SAM ist der KNOX Faktor (KNOTTED1 like HOMÖÖBOX) *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*) (Barton and Poethig, 1993). *STM* wird im gesamten SAM exprimiert, in Zellen, die zur Blatt- oder Blütenbildung rekrutiert wurden lässt sich kein Transkript mehr nachweisen, sobald diese mit der Differenzierung begonnen haben (Long et al., 1996). Die *stm* Verlustmutante bildet während der Embryogenese kein funktionales SAM. Postembryonal bilden sich Meristeme aus denen allerdings nur einzelne Rosettenblätter auswachsen, was vermuten lässt, dass *STM* notwendig ist, nicht nur für die Entstehung, sondern auch für die Aufrechterhaltung eines intakten Meristems, indem es die Proliferation von Stammzel-

len fördert (Clark et al., 1996; Endrizzi et al., 1996; Long et al., 1996). Des Weiteren inhibiert STM die Expression von *ASYMETRIC LEAVES 1* und *2 (AS1,2)* im SAM, wodurch eine vorzeitige Differenzierung der Stammzellen verhindert wird (Byrne et al., 2000; Byrne et al., 2002).

Beim Übergang von der vegetativen zur reproduktiven Entwicklungsphase ändern sich Wachstum, Geometrie und zelluläre Charakteristika des Infloreszenzmeristems (Kwiatkowska, 2006). Das *Arabidopsis* IM bildet rudimentäre Tragblätter, in deren Axeln florale Meristeme (FM) entstehen. Die Expressionsmuster von *LEAFY (LFY)* und *AINTEGUMENTA (ANT)* korrelieren mit der Bildung dieses Tragblattes (Long and Barton, 2000). Die Kontrolle der Stammzellpopulation in IM und FM wird weiterhin von *WUS* und *STM* gewährleistet (Laux et al., 1996; Long et al., 1996), in die Entstehung von FMs sind weiterhin eine Reihe von Genen involviert, wie *LEAFY (LFY)*, *APETALA 1, 2* und *3 (AP1,2,3)* und *AINTEGUMENTA (ANT)* (Weigel et al., 1992; Gustafson-Brown et al., 1994; Blazquez et al., 1997). *ANT* ist schon früh in Zellen exprimiert, die zu einem Blütenprimordium differenzieren und das FM bilden (Grandjean et al., 2004). Die ersten Zellen, in denen *LFY* exprimiert wird, differenzieren vermutlich zu einem rudimentären Tragblatt, in dessen Achsel das FM entsteht, wobei *LFY* zu einem späteren Zeitpunkt auch in Zellen exprimiert, die zur Bildung des FMs rekrutiert werden (Kwiatkowska, 2006).

Nach dem klassischen ABC-Model wird die frühe Musterbildung des FM durch die homöotischen Gene *API*, *AP2*, *AP3*, *PISTILLATA (PI)* und *AGAMOUS (AG)* reguliert, wodurch es zur Vormusterung von vier separierten Regionen kommt (Bowman et al., 1989, 1991; Coen and Meyerowitz, 1991; Wagner et al., 1999; Ng and Yanofsky, 2001; Lamb et al., 2002). Die Expression des A-Klasse-Gens *API* wird von *LFY* und *FLOWERING LOCUS T/FLOWERING LOCUS D (FT/FD)* positiv reguliert. *LFY* bindet direkt an die CArG-Box und aktiviert die Transkription von *API* (Koornneef et al., 1991; Kardailsky et al., 1999; Wagner et al., 1999; Wagner et al., 2004; William et al., 2004; Abe et al., 2005), wodurch die Entstehung von Sepalen und Petalen reguliert wird (Parcy et al., 1998; Wagner et al., 1999). Zusammen mit *UNUSUAL ORGAN FLOWERS (UFO)* bindet *LFY* direkt an die Promotorregion von *AP3* und *PISTILLATA (PI)* und aktiviert die Expression der B-Klasse-Gene (Chae et al., 2008), welche in die Spezifizierung von Petalen und Stamen involviert sind. Außerdem binden *LFY* und *WUS* ein Promotorelement im zweiten Intron von *AGAMOUS (AG)*, und aktivieren die Transkription im Zentrum des Meristems (Lenhard et al., 2001; Lohmann et al., 2001). *AG*, ein MADS-Box-TF ist das einzige bekannte C-Klasse-Gen, und reguliert die Entwicklung von Stamen und Karpellen (Bowman et al., 1989). Die Aufrechterhaltung des FM endet mit der Expression von *AG*. Unmittelbar nach der Aktivierung durch *WUS* unterdrückt *AG* die weitere Expression des MADS-Box-Gens, wodurch das florale Stammzellreservoir aufgebraucht bzw. nicht weiter aufrecht erhalten wird. *WUS* akti-

viert damit im FM den eigenen Repressor, und etabliert eine negative Rückkopplungsschleife, was letztlich die Regulation der Stammzellpopulation direkt in die floraler Musterbildung einbindet (Fletcher, 2002).

### 1.1.3 Phyllotaxis

Die Anordnung lateraler Organe entlang der Sprossachse, bezeichnet als Phyllotaxis, ist ein wichtiger Faktor bezüglich der Architektur einer Pflanze. Bei der Initiierung von Blättern oder Blüten durch das SAM kann zwischen drei verschiedenen Grundtypen unterschieden werden, der wechselständigen, gegenständigen oder spiraligen Phyllotaxis. Bei der spiraligen Anordnung, die am häufigsten vertreten ist, sind die Organe in einem Winkel von  $137,5^\circ$  zueinander angeordnet (Snow, 1934; Richards, 1951; Reinhardt, 2002). Die beiden ersten Blätter treten in *Arabidopsis* zweizeilig (distich) auf (Woodrick et al., 2000), nachfolgende Blätter werden spiralig (dispers) angelegt. Die Richtung der Spirale (im oder gegen den Uhrzeigersinn) ist variabel, aber konstant innerhalb einer Pflanze (Williams, 1975; Smyth et al., 1990; Medford et al., 1992; Callos and Medford, 1994). In *Arabidopsis* wird jedes Blatt von zwei Stipulen, auch Nebenblätter genannt begleitet (Medford, 1992), die an den beiden Seiten der Blattbasis auswachsen.

Bisher wurde eine Vielzahl von Modellen erstellt, um die Kontrolle der Phyllotaxis zu erklären. Dabei wurde der Einfluss physikalischer Faktoren vermutet, wie die Verfügbarkeit von Platz innerhalb des Meristems (Snow, 1931, 1933), oder Scherspannungen, verursacht durch die Ausdehnung des Apex oder der bereits existierenden Primordien und Blätter (Selker et al., 1992; Hernandez and Green, 1993). Außerdem wurde vermutet, dass Morphogene für die Initiierung von Blättern verantwortlich sind (Wardlaw, 1949; Turing, 1952). Phytohormone, vor allem Auxin und Gibberellin standen schon früh unter Verdacht, die Initiierung und Positionierung von Organen zu beeinflussen, obwohl der genau Einfluss dieser Hormone zunächst unklar blieb (Snow, 1937; Gorter, 1949; Gorter, 1951; Kiermayer, 1960; Schwabe, 1971).

Das Phytohormon Auxin stellte sich, als in eine Vielzahl von Prozessen in Pflanzen involviert, wie z.B. Embryogenese (Liu et al., 1993; Aida et al., 2002; Friml et al., 2004) und der Entwicklung von Wurzeln (Sabatini et al., 1999; Friml et al., 2002) und der Vaskulatur (Mattsson et al., 2003) heraus. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Auxin die Entstehung von Blättern und Blüten induziert (Okada et al., 1991; Reinhardt et al., 2000) und als Auslöser für die Bildung lateraler Organe auch für die Positionierung der Primordien, also die Phyllotaxis verantwortlich ist (Kuhlemeier and Reinhardt, 2001).

Eine Reihe von Beobachtungen lieferten bisweilen Indizien für die Beteiligung von Auxin bezüglich der Organpositionierung. Durch die Behandlung der Apices von Tomaten mit Auxin-Transportinhibitoren, konnte die Produktion von Blättern völlig unterdrückt werden, wobei die Meristeme eine herkömmliche Morphologie zeigten. Lokales Aufbringen von Auxin führte zur Produktion einzelner Blätter an der behandelten Position der peripheren Zone (Reinhardt et al., 2000). Die Behandlung der Verlustmutante von *PINFORMED1 (PIN1)*, einem Auxin-Efflux-Transporter (Galweiler et al., 1998) mit Auxin zeigte vergleichbare Ergebnisse. Die Verlustmutante besitzt ein funktionales Meristem, und zeigt keinerlei Defekte bezüglich der Stammzellproduktion und Aufrechterhaltung des SAM. Organprimordien, abgesehen von einigen missgebildeten Rosettenblättern, werden allerdings nicht gebildet. Durch lokales Aufbringen von exogenem Auxin auf die Apices von *pin1* Verlustmutanten kann die Bildung von Blütenprimordien jedoch induziert werden (Reinhardt et al., 2000), und junge *pin1* Pflanzen, welche mit IAA behandelt werden, bilden wildtypische Rosettenblätter (Reinhardt et al., 2003). Diese Beobachtung führt weiterhin zu der Vermutung, dass Auxin Organogenese induziert, die Organidentität jedoch von anderen Faktoren innerhalb des Meristems determiniert wird (Reinhardt et al., 2000). Das *Arabidopsis* Genom kodiert weiterhin vier putative Auxin-Influx-Transporter, *AUXIN RESISTANT 1 (AUX1)* und drei *LIKE AUX 1 (LAX)*, die als Quadrupel-Mutante ebenfalls eine Störung der Phyllotaxis aufweisen. Blütenprimordien werden nicht in einem Winkel von  $137^\circ$ , sondern unregelmäßig angelegt. Zwischenzeitlich kommt es auch zum Arrest der Blüteninitiierung, bis hin zur völligen Abwesenheit von Blütenprimordien, wie bei der *pin1* Mutante (Bainbridge et al., 2008). Als Konsequenz eines defekten polaren Auxintransports ergibt sich der Verlust einer klaren Grenzziehung innerhalb der peripheren Zone, deren Zellen sowohl Organcharakter, als auch die Identität von Grenzbereichen besitzen, wodurch es zur Blockierung der Organinitiierung kommt (Kuhlemeier and Reinhardt, 2001). Mit Hilfe von *DR5rev*, einem synthetischen Promotor, der mehrere kanonische *Auxin-Responsive Elements (AuxREs)* beinhaltet, konnten außerdem lokale Auxinmaxima nachgewiesen werden, dort wo neue Blütenprimordien initiiert wurden (Heisler et al., 2005). Die Auxinverteilung in den Apices der *aux1 lax* Quadrupelmutanten hingegen ist eher diffus. In Pflanzen mit mildem Phänotyp lassen sich schwache Maxima in der entstehenden Blütenprimordien nachweisen. In Pflanzen, die keine Blüten bilden wurde Auxin in der gesamten peripheren Zone, teilweise sogar im kompletten SAM nachgewiesen (Bainbridge et al., 2008).

Zusammen betrachtet demonstrieren die verschiedenen Daten eine wichtige Rolle für Auxin bezüglich der Phyllotaxis in *Arabidopsis*. Auxin wird zunächst akropetal Richtung Meristem transportiert, wo es von den Primordien absorbiert wird, was dazu führt, dass es aus den Zellen in der Peripherie entfernt wird (Reinhardt et al., 2003; Smith et al., 2006). An der Stelle, die am weitesten entfernt von den beiden jüngsten Primordien

entfernt liegt, kann ein neues Maximum akkumulieren, aus dem ein weiteres Primordium entsteht. Dieser Mechanismus wird zum einem durch eine positive Rückkopplungsschleife, der Auxin Akkumulation in den Primordien, als auch durch laterale Inhibition, durch das Entfernen von Auxin aus dem umliegenden Gewebe, reguliert.

#### **1.1.4 Aufbau und Entwicklung der *Arabidopsis* Blüte**

*Arabidopsis* besitzt eine für Brassicaceae typische Anatomie, mit vier Sepale, vier Petalen, sechs Stamen und einen aus zwei Karpellen bestehenden Gynoeceum. Trotz dieses sehr simplen Aufbaus ist die Frage des Ursprungs der einzelnen Organe immer noch unklar. Vor morphologischen und systematischen Hintergrund wird ein Wirtel klassischer Weise als ein Kreis von Organen definiert (Endress, 1992). Molekulargenetisch betrachtet bezeichnet ein Wirtel heutzutage eine Region der Blüte, aus der ein einzelner Organtyp entsteht (Bowman et al., 1989; Bowman and Meyerowitz, 1991).

Dies bezüglich sind heute drei verschiedene Theorien in Umlauf (Arber, 1931; Lawrence, 1951; Endress, 1992), wobei die Vier-Blütenwirtel-Theorie momentan die gebräuchlichste ist. Laut dieser Theorie belegen die verschiedenen Organtypen jeweils einen separaten Wirtel. Die drei äußeren Wirtel bestehen aus jeweils vier Organen, wobei es im dritten Wirtel zu Duplikation der medialen Stamen kam, woraus die lateralen Stamen entsprungen sind (De Candolle, 1821). Der innerste Wirtel besteht aus nur zwei Karpellen, die das Gynoeceum bilden. In einer anderen Theorie besteht die Blüte aus fünf Wirteln mit je vier Organen, wobei die lateralen und medialen Stamen getrennte Wirtel belegen, und es im dritten Wirtel evolutionär zum Verlust zweier lateralen Stamen kam. Der fünfte, innere Wirtel besteht ebenfalls aus vier Organen, zwei sterilen Karpellen, die die äußere Hülle des Fruchtknoten bilden und zwei fertilen Karpellen, aus denen die Plazenta geformt wird (Lestiboudois, 1826; Merxmüller, 1967). Alternativ dazu bestehen die einzelnen Wirtel nach der Sechs-Blütenwirtel-Theorie aus jeweils zwei Organen (Steinheil, 1839; Alexander, 1952). Die lateralen und medialen Sepalen belegen jeweils einen separaten Wirtel, wobei unklar ist, welche der Organe dem äußersten Wirtel entstammen (Arber, 1931). Die vier Petalen stammen aus einem einzigen Wirtel, wobei sie durch Duplikation aus ursprünglich zwei Organen entstanden sind (Endress, 1992). Mutmaßliche Vorfahren besäßen somit zwei Petalen, die Petalenprimordien teilten sich in zwei Subdomänen, aus denen dann komplette Organen entsprungen sind. Die sechs Stamen sind ebenfalls auf zwei Wirtel verteilt, mit den beiden lateralen im vierten, den medialen, ebenfalls duplizierten Stamen im fünften Wirtel. Den sechsten Wirtel bilden die beiden Karpelle.

Die Entwicklung individueller *Arabidopsis* Blüten ist von der Entstehung der Blütenprimordien bis zur Dehiscenz der Schote ausführlich beschrieben (Vaughan, 1955; Müller, 1963; Bowman et al., 1989). Anhand morphologischer Kriterien wurde die Blütenentwicklung in verschiedene Stadien eingeteilt (Tab.1) (Smyth et al., 1990).

Blütenprimordien entstehen in der Peripherie des Infloreszenzmeristems (IM) in einer phyllotaktischen Spirale (Stadium 1), und werden kurz darauf durch eine Furche vom IM getrennt (Stadium 2) (Smyth et al., 1990). Die Blütenorganprimordien entwickeln sich nach einem streng geordneten Muster sequentiell aus dem floralen Meristem (FM). Die vier Sepalenprimordien sind die ersten, morphologisch sichtbaren Strukturen. Sie entstehen kreuzförmig, wobei das abaxiale Sepalenprimordium früher elaboriert, als die lateralen und das adaxiale (Stadium 3,4). Die vier Petalenprimordien und sechs Stamenprimordien werden annähernd simultan initiiert (Stadium 5). Im Zentrum des Blütenprimordiums wird das Gynoeceum bestehend aus zwei Karpellen gebildet. Blüten in Stadium 5-6 bestehen aus vier bereits differenzierenden Sepalen, die restlichen Organprimordien sind zu diesem Zeitpunkt bereits angelegt, aber noch völlig undifferenziert und nicht irreversibel determiniert (Bowman et al., 1989; Bowman and Meyerowitz, 1991). Während die Zellidentität für die inneren Organe noch teilweise oder vollständig unspezifiziert ist, ist die Identität von Zellen der äußersten Organprimordien schon festgelegt, und deutliche Charakteristika der Sepalenentwicklung können beobachtet werden (Stadium 5). Die Zellidentität der einzelnen Organe scheint abhängig von ihrer Position innerhalb des Blütenprimordiums. Die Identität der Stamenprimordien wird ab Stadium 6 determiniert, und es kommt zu irreversiblen Entwicklungsschritten. Die Spezifizierung von Zellen der Petalen scheint bis zu einem relativ späten Zeitpunkt der Blütenentwicklung reversibel (Bowman et al., 1989; Bowman and Meyerowitz, 1991). Während der Spezifizierung der Identität einzelner Blütenorgane unterläuft jedes Organprimordium einen organspezifisches Entwicklungsprogramm. Im Laufe der Differenzierung entstehen sowohl organspezifische, als auch allgemeine Zelltypen. Morphologische Anzeichen für Differenzierung lassen sich für Stamen und Karpelle ab Stadium 7 beobachten, in Petalen ab Stadium 9.

Stadium	Orientierungspunkt zu Beginn des Stadiums	Dauer in Stunden (h)	Alter der Blüte zum Ende des Stadiums in Tagen (t)
1	Auswölbung an der Peripherie des IM	24	1
2	Furche separiert BP von IM	30	2,25
3	Sepalenprimordien erheben sich	18	3
4	Sepalenprimordien überwachsen FM	18	3,75
5	Petalen- und Stamenprimordien erheben sich	6	4
6	Sepalen umschließen das BP	30	5,25
7	Mediale Stamenprimordien bilden stielförmige Basis	24	6,25
8	Antheren der medialen Stamen differenzieren	24	7,25
9	Petalenprimordien bilden stielförmige Basis	60	9,75

**Tabelle 1:** Zusammenfassung der einzelnen Stadien der Blütenentwicklung in *Arabidopsis thaliana*. Die wichtigsten Merkmale, die ein Stadium definieren wurden aufgelistet und die Dauer der einzelnen Stadien bzw. das Alter der Blüte eines Stadiums bestimmt (Smyth et al., 1990).

## 1.2 Die AP2-Familie

In *Arabidopsis* kodieren etwa 5,9% der geschätzten Anzahl von Genen Transkriptionsfaktoren. Eine der größten Familien ist die AP2/ERF-Familie, die in *Arabidopsis* aus 147 Mitgliedern besteht (Feng et al., 2005). Diese TF-Familie ist pflanzenspezifisch, und alle Mitglieder besitzen eine hoch konservierte, etwa 60 Aminosäuren lange DNA-Bindedomäne, die *APETALA2 (AP2)/ETHYLENE-RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR (ERF)* Domäne (Riechmann and Meyerowitz, 1998; Riechmann et al., 2000). AP2-Transkriptionsfaktoren sind in viele Prozesse von Pflanzen Wachstum und Entwicklung involviert, wie z.B. Organidentität der Blüte, Hormonsignaltransduktion oder Differenzierung von Zellen, und in Antwort auf biotischen und abiotischen Stress (Riechmann and Meyerowitz, 1998; Riechmann et al., 2000). Die Familie kann, basierend auf der Aminosäuresequenz in fünf Subfamilien unterteilt werden in *APETALA2 (AP2)*, *DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN (DREB, A1–A6)*, *ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR (ERF B1–B6)*, *RELATED TO ABI3/VP1 (RAV)* und Andere (Sakuma et al., 2002).

Mitglieder der AP2-Subfamilie enthalten zwei AP2-Domänen (Jofuku et al., 1994; Weigel, 1995; Okamoto et al., 1997). Für *AINTEGUMENTA (ANT)* konnte direkte DNA-Bindung des Proteins nachgewiesen werden. Der TF bindet an das Motiv

gCAC(A/G)N(A/T)TcCC(a/g)ANG(c/t), wobei die Länge dieser Sequenz vermuten lässt, dass ANT mit beiden AP2-Domänen parallel an die Sequenz bindet (Krizek et al., 2000). WRINKLED (WRI1), ebenfalls ein Mitglied der AP2-Subfamilie erkennt eine konservierte Sequenz, die als AW(ASL1/WRI1)-Box bezeichnet wird, und aus der Basenfolge CnTnG(n)<sub>7</sub>CG besteht (Maeo et al., 2009). Mitglieder der RAV-Subfamilie besitzen neben der AP2-Domäne noch eine zweite DNA-bindende Region. Für RAV1 konnte bereits gezeigt werden, dass eine zweiteilige Sequenz erkannt wird, wobei die AP2-Domäne an ein CAACA Motiv bindet, die B3-Domäne interagiert mit der Sequenz CACCTG. Beide Domänen binden unabhängig von einander die spezifische DNA-Sequenz, der Komplex ist allerdings deutlich stabiler, wenn beide Domänen vorhanden sind (Kagaya et al., 1999). Die Mitglieder der ERF- und DREB-Subfamilien besitzen nur eine AP2-Domäne. Diese beiden Subfamilien sind die größten, und werden in jeweils sechs Gruppen aufgeteilt (*DREB A1-6*; *ERF B1-6*). Für verschiedene DREBs, wie z.B. CBF1-3 und DREB1A, DREB2A konnte direkte Bindung an die Sequenz A/GCCGAC, das sogenannte *Dehydration-Responsive-Element (DRE)/C-repeat* nachgewiesen werden (Liu et al., 1998; Sakuma et al., 2002; Zhao et al., 2006). Mitglieder der DREB-Subfamilie sind vor allem an Reaktionen der Pflanze auf abiotischen Stress, wie extreme Temperaturen, hohe Salinität oder Trockenheit (Stockinger et al., 1997; Liu et al., 1998) beteiligt. Die ERFs besitzen in Pflanzen eine bedeutende Funktion für die Reaktion auf biotischen Stress. Für einige Mitglieder (EBP, ERF1-5 und ORA59) konnte spezifische DNA-Interaktion mit der 11Bp langen Sequenz TAAGAGCCGCC, mit dem Kernmotiv GCCGCC nachgewiesen werden (Ohme-Takagi and Shinshi, 1995; Hao et al., 1998; Fujimoto et al., 2000; Zarei et al., 2011). Diese GCC-Box, oder auch *Ethylene-Response-Element (ERE)* findet sich in einigen Promotoren Ethylen-induzierbarer Gene, die in Pathogenese oder Wundstress involviert sind (Ohme-Takagi and Shinshi, 1995; Buttner and Singh, 1997; Ohme-Takagi et al., 2000; Zarei et al., 2011).

Die Einteilung innerhalb der AP2/ERF-Familie in verschiedene Subgruppen basierend auf Homologie, lässt jedoch nicht immer Rückschlüsse bezüglich ihrer Sequenzspezifität zu. Bisher wurde nur für wenige, der 147 Mitglieder dieser Transkriptionsfaktor-Familie spezifische DNA-Bindung nachgewiesen, und es wurden mittlerweile verschiedene DREB/ERFs charakterisiert, die dieser strikten Einteilung widersprechen. Das DREB TINY bindet mit gleicher Affinität an die DRE-, als auch an die GCC-Box, wodurch es zur Verknüpfung der verschiedenen biologischen Funktionen von DREBs und ERFs kommt. Entscheidend für die Erkennung der GCC-Box durch TINY ist Ser15 der AP2-Domäne (Sun et al., 2008). ABA-INSENSITIVE 4, das ebenfalls der DREB-Subfamilie angehört zeigt spezifische DNA-Bindung an die Sequenz CCAC und ist involviert in die Koordinierung nukleärer Expression von chloroplastenspezifischen Genen (Koussevitzky et al., 2007). *Sakuma et al* mutierten einzelne Basen der DRE-

Sequenz, und konnten zeigen, dass bei einem Basentausch an der 2. (A→C/T) oder 3. Position (C→T) DREB1A trotzdem interagieren konnte, DREB2A hingegen keine spezifische Bindung mehr zeigte (Sakuma et al., 2002). Damit wurde gezeigt, dass diese beiden, nahe verwandten Proteine, obwohl Beide die selbe Sequenz präferieren, doch qualitativ unterschiedlich bezüglich ihrer Bindeeigenschaften sind. Des Weiteren wurde in *Nicotiana tabacum* zwei ERFs, *wound-responsive AP2/ERF-like factor 1 (WRAF1)* and *WRAF2* gefunden, die spezifisch an das *vascular-system-specific and wound-responsive-cis-element (VWRE)* mit der Sequenz GAAAAGAAAATTTC binden (Sasaki et al., 2006).

Die Struktur der AP2-Domäne und des Protein-DNA-Komplexes konnte für AtERF1 mittels Kernspinresonanzspektroskopie aufgeklärt werden (Allen et al., 1998). Die AP2-Domäne kann in zwei strukturell und funktionell verschiedene Bereiche unterteilt werden. Drei anti-parallele  $\beta$ -Faltblätter bilden die DNA-Bindedomäne. Diese sind gegen eine  $\alpha$ -Helix gepackt, die selber nicht direkt an DNA bindet, sondern das Rückgrat darstellt. Bei AtERF1 wird das dreisträngige  $\beta$ -Faltblatt von den AS Val149 bis Phe176 gebildet, die  $\alpha$ -Helix besteht aus den AS Thr178 bis Arg194. Die Struktur wird stabilisiert durch eine Vielzahl hydrophober Bindungen, sowohl innerhalb, als auch zwischen den beiden Teildomänen. In der  $\alpha$ -Helix befinden sich eine Vielzahl von Ala-Resten, die mit großen, hydrophoben AS-Resten aus den  $\beta$ -Faltblättern interagieren (Phe157, Phe176, Val171 und Ile161).  $\beta$ -Faltblatt 2 verläuft parallel zur  $\alpha$ -Helix, 1 und 3 liegen antiparallel dazu. Die Konfirmation der Domäne wird durch die Bindung an ihre Zielsequenz kaum beeinflusst. Sie bindet an die große Furche der GCC-Box, wobei die N→C Richtung von Strang 2 des  $\beta$ -Faltblatts parallel zur 5'→3' Richtung der DNA läuft. Verantwortlich für die spezifische Bindung an die GCC-Box sind vor allem die Guanidyl-Gruppen vierer Argininreste, Arg150, Arg152, Arg162 und Arg170, die hydrophobe Wechselwirkungen (*Van-der-Waals*-Kräfte) mit fünf Guanin-Basen. Des Weiteren bilden Arg150, Arg162 und Arg170 hydrophobe Interaktionen zu Pyrimidinbasen. Der aromatische Ring von Trp154 und Trp172 interagiert über hydrophobe Wechselwirkungen mit vier verschiedenen Basen. Diese Interaktionen werden als die spezifische Bindung an das konservierte Erkennungsmotiv beschrieben. Stabilisiert wird der Komplex durch eine Reihe von unspezifischen Bindungen, die teilweise zwischen den bereits erwähnten AS über hydrophobe Interaktionen mit der Desoxyribose oder ionische Bindungen mit dem Phosphatrest des Rückgrats bestehen, aber auch zwischen anderen AS mit dem Rückgrat. Die AS Gly148, Lys156 und Thr186 interagieren ebenfalls mit verschiedenen Zucker- und Phosphat-Resten, wobei Thr186 als einzige DNA-bindende AS zum  $\alpha$ -helikalen Teil der Domäne gehört. Die unspezifischen Bindungen sorgen nicht nur für eine erhöhte Stabilität des Komplexes, sondern auch für die Bildung der spezifi-

schen Bindungen, indem die DNA in die richtige Position relativ zur AP2-Domäne gebracht wird, bevor die spezifischen Basen erkannt werden (Allen et al., 1998).

Die an der Protein-DNA-Interaktion beteiligten AS sind, abgesehen von Lys156 innerhalb der kompletten AP2/ERF-Familie hoch konserviert. Unklar dabei ist, wie die verschiedenen Proteine trotzdem eine unterschiedliche Sequenzspezifität aufweisen können, und Genexpression in von einander unabhängigen Signaltransduktionswegen regulieren. Da für ERF1 gezeigt wurde, dass der Rest des Proteins keine Auswirkung auf die Konfirmation der AP2-Domäne und ihre Bindeeigenschaften hat (Allen et al., 1998), müssen andere AS innerhalb der Domäne Einfluss darauf haben. Neben den direkt interagierenden AS konnten in der DREB-Subfamilie bereits nicht direkt interagierende AS als essentiell für die Komplexbildung identifiziert werden. In der DREB-Subfamilie sind die AS Val14 und Glu19 der AP2-Domäne hoch konserviert, wohin gegen man bei den meisten ERFs an dieser Position Ala14 und Asp19 findet. DREB1A mit einer AS-Substitution von Val14 nach Ala14 bindet nicht mehr an das spezifische DRE-Motiv. Werden bei DREB2A beide AS-Reste ausgetauscht (Val14→Ala14 und Glu19→Asp19) wird neben der DRE-Sequenz auch die GCC-Box als spezifische Bindestellen erkannt (Sakuma et al., 2002). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Ala37, ebenfalls eine hoch konservierte AS in der  $\alpha$ -Helix, eine entscheidende Rolle bei der Protein-DNA-Interaktion beider Subfamilien spielt (Liu et al., 2006).

### **1.3 Dornröschen und Dornröschen-like**

Interessanterweise konnte bereits für einige ERFs gezeigt werden, dass sie in verschiedene Entwicklungsprozesse, und nicht in die Reaktion auf biotischen Stress involviert sind. Die Überexpression von *TINY* führt z.B. zur Verringerung der Zellelongation und damit zu Pflanzen mit reduzierter Organgröße (Wilson et al., 1996). Bei der Funktionsgewinnmutante von *LEAFY PETIOLE (LEP)* wurden Blätter mit fehlenden Petiolen, verkürzten Schoten und eine allgemein verzögerte Entwicklung der Pflanzen beobachtet (van der Graaff et al., 2000). Auch für die beiden Mitglieder der AP2-Familie *DORN-RÖSCHEN (DRN)* und *DORNRÖSCHEN-LIKE (DRNL)* konnte die Beteiligung an verschiedenen Entwicklungsprozessen gezeigt werden.

*DRN* wurde auf der Suche nach bislang unbekanntem Genen, die die Funktion des SAMs beeinflussen, entdeckt. Mit Hilfe eines Transposon-vermittelten Aktivierungsmutagenesesystems (*Transposon mediated Activation tagging Mutagenesis in Arabidopsis*, TAMARA), welches in *Arabidopsis thaliana* etabliert werden konnte, wurde die *Dornröschen-ID* Mutation, in der *DRN* ektopisch exprimiert wird, identifiziert (Kirch et

al., 2003). Als Konsequenz dieser Fehlexpression kommt es zum Verlust der Meristemaktivität im vegetativen Meristem, Infloreszenzmeristem und in floralen Meristemen. Das SAM stellt seine Aktivität nach der Bildung von 6 bis 7 Rosettenblättern ein, vergrößert sich und bildet in unregelmäßigen Abständen nadelförmige Filamente. Diese Pflanzen bilden erst nach vielen Wochen sekundäre Infloreszenzen, die meist ebenso arretieren, teilweise aber Blüten bilden und schließlich Samen produzieren (Kirch et al., 2003). *Banno et al.* (2001) beobachteten die Cytokinin-unabhängige Regeneration von Sprossen aus Wurzelgewebe durch konstitutive Überexpression von *DRN*, benannt als *ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 1 (ESR1)*, woraus geschlossen wurde, dass *DRN* synergistisch zu Cytokinin agiert.

*DRNL* ist interessanterweise ebenfalls in Aktivierungsmutagenese-Experimenten in *Arabidopsis* aufgefallen (Ward et al., 2006). In *sob2-D phyB-4 (suppressor of phytochrome B-4 [phyB-4]#2 dominant)* wurde, durch Überexpression von *SOB2/DRNL* in der *phyB-4* Mutante der Hypokotyl-Phänotyp der Mutante unterdrückt. Ein direkter Beitrag von *DRNL* zur Hypokotylentwicklung im Rahmen des normalen Pflanzenwachstums ist jedoch eher unwahrscheinlich, da bisher keine Transkription in wildtypischen Keimlingen und adulten Geweben nachgewiesen werden konnte (Ward et al., 2006). In einem unabhängigen Screen von überexprimierenden Pflanzen fiel die *bolita-D (bol-D)* Mutante durch starken Zwergphänotyp auf (Marsch-Martinez et al., 2006). Die ektopische Expression von *BOL/DRNL* führt zu einer allgemeinen Verzögerung der Entwicklung, die Pflanzen weisen eine deutlich reduzierte Fertilität auf, und Blätter, Knospen, Blüten und Schoten sind missgebildet. Konstitutive Überexpression von *DRNL* durch den 35S-Promotor führte zu einem vergleichbaren Phänotyp, wobei die stärksten Phänotypen sogar sowohl männlich als auch weiblich steril sind (Kirch et al., 2003; Nag et al., 2007).

Die *drn-1* und *drnl-1* Einzelmutanten zeigen beide pleiotrope Defekte in der Entwicklung der Keimblätter mit geringer Penetranz, wobei das SAM stets voll funktional ist (Chandler et al., 2007). Die *drn drnl* Doppelmutante weist diese Defekte mit einer erhöhten Penetranz auf, was auf Redundanz der beiden Gene bezüglich der Kotyledonentwicklung schließen lässt. Die *drn* Mutante zeigt außerdem während der Embryogenese einen Zellteilungsdefekt in der Hypophyse, der in der *drnl* Mutante nicht zu finden ist. Auch dieser Phänotyp ist in der Doppelmutante mit stark erhöhter Frequenz vertreten und zeigt sich mit annähernd voller Penetranz (94%). Des Weiteren lässt sich eine Varianz bezüglich der Anzahl verschiedener Blütenorgane, hauptsächlich der Stamen, in der *drnl* Mutante beobachten, die in *drn* nicht auftritt (Chandler, nicht veröffentlicht).

Durch Mutagenese von *pistillata-5 (pi-5)* Pflanzen mit Ethylmethansulfonat (EMS) wurde nach Mutanten gesucht, die den *pi-5* Phänotyp verstärken oder abmildern. Dabei wurde ein starkes Allel von *drnl* als *b-class-modifier (bcm)/drnl-2* Funktionsverlustmut-

ante entdeckt, welches den Blütenphänotyp von *pi-5*, bei dem die Organe des zweiten Wirtels Sepalen statt Petalen entsprechen, verstärkt. In der Doppelmutante bilden sich meist filamentöse Strukturen statt Stamen, teilweise auch keine Organe im dritten Wirtel, was dazu führt, dass die Doppelmutante grundsätzlich männlich steril ist. Dieser Phänotyp wurde ähnlich auch in der *bcm/drnl-2* Einzelmutante festgestellt, die in Vergleich zur Doppelmutante, wenn auch nur selten, fertile Stamen besitzt (Nag et al., 2007).

DRN wird der Gruppe B1 der ERF-Subfamilie zugeteilt, unter anderem zusammen mit ERF3, ERF4, LEP und dem nächst verwandten Protein DRNL (Sakuma et al., 2002). Für DRN konnte bereits spezifische Interaktion mit der GCC-Box beobachtet werden (Banno H., 2006). *DRN* und *DRNL* sind im Abstand von etwa 24cM auf Chromosom 1 lokalisiert. Beide Proteine besitzen im Vergleich zur AP2-Subfamilie nur ein DNA bindendes Motiv und werden stets nur von einem Exon kodiert (Riechmann *et al.*, 1998). Die Homologie von DRN und DRNL lässt vermuten, dass sie aus einer intrachromosomalen Genduplikation entstanden sind. Die beiden Proteine besitzen eine Ähnlichkeit von 57% bei einer Identität von 31%, die AP2-Domänen beinhalten allerdings nur sechs unterschiedliche AS-Reste, und besitzen damit eine Ähnlichkeit von 94% mit 90% Identität. Abgesehen von der AP2-Domäne konnten keine bekannten funktionellen Domänen oder Struktur motive identifiziert werden. Auch fehlt es an klassischen Kernlokalisierungs-Signalen (Hicks et al., 1995). Die transiente Expression der isolierten AP2-Domäne von DRN fusioniert mit GFP, zeigte jedoch ein Zellkern-spezifisches Signal, was eine Kernlokalisierungs-Sequenz innerhalb der AP2-Domäne vermuten lässt (Matsuo and Banno, 2008).

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten die Expression der beiden Mitglieder der AP2-Familie *DRN* und *DRNL* während verschiedener Entwicklungsphasen genauer analysiert und verglichen werden.

Des Weiteren sollten mögliche Zielgene von *DRN* und *DRNL* identifiziert werden, um die biologische Funktion der beiden putativen AP2-Transkriptionsfaktoren zu evaluieren. Dabei wurde einerseits die direkte Interaktion von DRN und DRNL mit einer spezifischen DNA-Sequenz untersucht, um mögliche Zielsequenzen zu identifizieren. Außerdem wurde nach allgemeinen Zielgenen gesucht, die von *DRN* und *DRNL* reguliert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Bakterienstämme

Zur Klonierung und Amplifikation von Plasmid-DNA wurde der Bakterienstamm *E.coli* DH5 $\alpha$  (Hanahan, 1983) verwendet. Für die Expression rekombinanter Proteine wurden die Stämme *E.coli* BL21DE3 (Phillips et al., 1984) und *E.coli* M15(pREP4) (*Qiagen*, Mannheim) eingesetzt. Zur Transformation von *Arabidopsis Col-0* wurde der *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm GV3101(Konczi et al., 1986) benutzt.

#### 2.1.2 Klonierungs- und Expressionsvektoren

Es wurden folgende Vektoren verwendet:

- pCR II TOPO (*Invitrogen*, Karlsruhe): Subklonierung von PCR-Fragmenten
- pGPTV/*BaR/AscI* oder pGPTV/*Kan/AscI* (Überlacker et al., 1996): Die binären T-DNA Vektoren enthalten innerhalb der T-DNA Grenzen neben einem BASTA oder Kanamycin Resistenzgen das *GUS* Markergen *uidA*.
- pIVEX 2.5d und pIVEX 2.6d (*Roche*, Mannheim): Expressionsvektoren für zellfreie Proteinsynthese mit n-terminalen (2.6d) oder c-terminalem (2.5d) HA-Epitop
- pQE-30 UA (*Qiagen*, Mannheim): Expressionsvektor für das *Qiaexpress*-System. Synthetisierte Proteine erhalten ein n-terminales His-Epitop (6xHis).

#### 2.1.3 Verwendete Desoxyoligonukleotide

Für die durchgeführten Polymerasekettenreaktionen wurden folgende Oligonukleotide (Sequenz 5' zu 3') bei der Firma *Sigma* (Darmstadt) bezogen:

Oligonukleotide zur Klonierung der *DRNL* Reportergene

XmaCI-GFP_F	CCCGGGATGAAGACTAATCTTTTTCTC
XmaCI-GFP_R	CCCGGGTTAAAGCTCATCATGTTTGTA
BamHI-CFP_F	GGATCCATGGTGAGCAAGGGCGA
SacI-CFP_R	GAGCTCCCCGGGCTACTTGTACAGCT
XmaCI-DRNL_F	CCCGGGATGGAAGAAGCAATC
BamHI-DRNL_R	GGATCCATAATCATCATGAAAG

## Oligonukleotide zur Klonierung der Konstrukte für die Proteinsynthese

### 1. Klonierung in pIVEX2.5d/2.6d

DRN-RTS-F	TATCCATGGAAAAAGCCTTGAGAAA
DRN-RTS-R	TATCCCGGGTCCCACGATCTTCGGCAAGT
DAP2-RTS-F	TATTCATGAGGTACCGCGGCGTACGCCGGA
DAP2-RTS-R	TATCCCGGGAGTAAAATTAGTACGAGCCTTTGCT
DRNL-RTS-F	TATCATGAAAGAAGCAATCATGAGAC
DRNL-RTS-R	TATCCCGGGATAATCATCATGAAAGCAATAC
DLAP2-F	CCCGGGATGAGGTACCGAGGCGTGAGGCGTAGG
DLAP2-R	CCCGGGGACGAAGTTGGTTCGAGCTTTAA
DREB1A-RTS-F	TATCCATGGACTCATTCTGCTTT
DREB1A-RTS-R	TATCCCGGGCGTCGCATCACACATCTCAT

### 2. Klonierung der Chimären in pIVEX2.5d/2.6d

DAP2-R-Ad	CCACGGCCTCCGGCGTACGCCGCGGTACCTCGAAGATTTCTTGTGGA AAA
DLAP2-F	CCCGGGATGAGGTACCGAGGCGTGAGGCGTAGG
DLAP2-R	CCCGGGGACGAAGTTGGTTCGAGCTTTAA
DLAP2-R-Ad	CCTACGCCTCACGCCTCGGTACCTATTCATTGGAGGAGACGAGAAAAT
DRN-R-Ad	GGCAACGTGCTGAGCTCGAGCTGCCATCTCAGCGGTGTCAAATGTTCCG AGCCAAC
DREBhelix-F	ACCGCTGAGATGGCAGCTCGAGCTCAC
DRN-F2-Ad	CCCTTCGTGGCCGATCAGCCTGTCTCAATTCGCTTATCCGACAGCTGT CATTAT
DREBhelix-R	AGCGAAATTGAGACAGGCTGATCG
DRNL-R-Ad	GCGGCAACGTCGTGAGCTCGAGCTGCCATCTCAGCGGTGTCAA TGTTCCGAGCCATCGTCT
DRNL-F2-Ad	CCCTTCGTGGCCGATCAGCCTGTCTCAATTCGCTTACCAATGCCTTCT CTCGACT
DREB-R2	TTGAAATGTTCCGAGCCAAATCCTT
DREB-F2	GACTCGGCTTGGAGACTCCGAAT
DRNhelix-F-Ad	CCAAACAAGAAAACAAGGATTTGGCTCGGAACATTTCAAACGGCGGA ACAAGCCGCTTGT
DRNhelix-R-Ad	CGCAAGTTGATTCCGGGATTCGGAGTCTCCAAGCCGAGTCAGTAAAAT TAGTACGAGCCTTTGCT
DRNLhelix-F-Ad	CCAAACAAGAAAACAAGGATTTGGCTCGGAACATTTCAAACGGCCG AGGAAGCAGCTTGC GCA
DRNLhelix-R-Ad	CGCAAGTTGATTCCGGGATTCGGAGTCTCCAAGCCGAGTCGACGAAG TTGGTTCGAGCTTT
DRNLnAd-R2	GGAGTTTCTCCGACGAACTCCTCTGTATATTATCGTAGAGACACCGGA AGC
DREBap2-F	ATATACAGAGGAGTTCGTCCGAGAAA
DRNnAd-R2	GGAGTTTCTCCGACGAACTCCTCTGTATATCGTCGTGCTGCTGCCAG CTCCGGC
DREBn-R	TGGGTGACGAGTCTCACGAACTT
DRNap2Ad-F	CGTAAGAAGTTTCGTGAGACTCGTCACCCAAGGTACCGGGCGTAC GCCGGAGG
DRNLap2Ad-F	CGTAAGAAGTTTCGTGAGACTCGTCACCCAAGGTACCGAGGCGTGA GGCGTAGG

### 3. Klonierung in pU30 zur Expression in *E.coli*

DRN-F	ATGGAAAAAGCCTTGAGAACTT
DRN-R	TCCCCACGATCTTCGGCAAGT
DRNL-F	ATGGAAGAAGCAATCATGAG
DRNL-R	ATAATCATCATGAAAGCAATA

### Oligonukleotide zur Verwendung für *EMSA* und *CASTing*

wGCCs	GATCCAGAGCCGCCACTA
wGCCas	GATCTAGTGGCGGCTCTG
mGCCs	GATCCAGATCCTCCACTA
mGCCas	GATCTAGTGGAGGATCTG
wDREB1As	GATCCAGATACCGACATACTA
wDREB1Aas	GATCTAGTATGTCGGTATCTG
CAST-R76	CAGGTCAGTTCAGCGATCCTGTTCGNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNGAGGCGAATTCAGTGCAACTGCAGC
CAST-F	GCTGCAGTTGCACTGAATTCGCCTC
CAST-R	CAGGTCAGTTCAGCGGATCCTGTTCG

## 2.2 Methoden

Alle molekularbiologischen Methoden erfolgten nach *Current Protocols in Molecular Biology Volume 2* (Wiley, 1996) oder nach Herstellerangaben und werden nicht näher beschrieben.

### 2.2.1 Nicht-radioaktive RNA *In situ* Hybridisierung (ISH)

Die *ISH* wurde nach einem gebräuchlichen Laborprotokoll durchgeführt (ausführliche Beschreibung siehe Dissertation Durantini, 2009).

Als Sonde für *DRNL* wurde ein 562 bp langes DNA-Fragment verwendet, von Position 348-918 *downstream* des Transkriptionsstarts.

### 2.2.2 Klonierung der Chimären

Die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Chimären wurden mittels Fusions-PCR (Charlier et al., 2003; Szewczyk et al., 2006) erzeugt. Diese Methode erlaubte den Austausch von einzelnen DNA-Abschnitten der Protein kodierenden Sequenz, indem einzelne Teilbereiche mit anhängenden Adaptersequenzen synthetisiert werden, welche im nächsten Schritt hybridisieren und danach als ein Produkt polymerisiert werden. Vorteil dieser Methode gegenüber der klassischen Klonierung unter Verwendung von Restriktionsendonukleasen ist die völlige Unabhängigkeit von Schnittstellen. Somit kann der gewünschte Teilbereich exakt entfernt bzw. ausgetauscht werden, ohne dass die Sequenz durch die Erzeugung etwaiger neuer Schnittstellen verändert wird.

### 2.2.3 Proteinsynthese und Aufreinigung

Für die *in vitro* Proteinsynthese wurden drei verschiedene Systeme verwendet, *EasyXpress Protein Synthesis Kit* (Qiagen, Hilden), *Rapid Translation System RTS 100* (Roche, Mannheim) und *TNT SP6 High-Yield Wheat Germ Protein Expression System* (Promega, Mannheim). Dabei wurde sich an die Herstellerprotokolle gehalten. Für die Aufreinigung der *in vitro* translatierten Proteine über ein HA-Epitop wurden *MACS-MicroBeads anti-HA* (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach) verwendet.

Die Proteinexpression in *E.coli* erfolgte mit einem kompletten Klonierungs-, Expressions- und Aufreinigungskit (*QiaExpress*, Qiagen, Mannheim). Die Aufreinigung der mit His-Epitop versehenen Proteine erfolgte über *Ni-NTA* unter nativen Bedingungen.

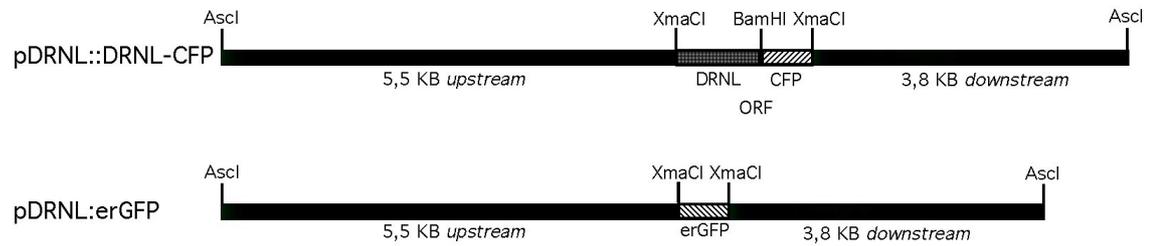
### 2.2.4 EMSA und CASTing

Bei den *EMSA*s wurde sich grundlegend nach *Buratowski und Chodosh* (Buratowski and Chodosh, 2001) oder nach den für *DREB1A* getesteten Bedingungen (Urao et al., 1993; Liu et al., 1998) gerichtet, wobei die Parameter variierten. Es wurden die Puffersysteme TBE, TAE und Tris-Glycin getestet, der pH-Wert bewegte sich zwischen 7,0-8,0 und es wurden verschiedene Konzentrationen (6-10%) und Vernetzungen (1:40-1:80) für die Acrylamid/Bis-Acrylamid-Gele verwendet. Außerdem wurden verschiedene Bindebedingungen getestet, wobei die Temperatur (4°C-RT), pH-Wert (7,0-8,0), Salz- (50-200 mM) und BSA-Konzentration (0-300 µg/ml) variierten. Bei den Konkurrenzversuchen wurden je 0,1-5 µg spezifischer oder unspezifischer Kompetitor eingesetzt.

Die *CASTings* erfolgten grundlegend nach *Pollock* (Pollock, 2001). Es wurde zwei unabhängige Experimente durchgeführt, mit sechs IPs und abschließendem *bandshift* bzw. mit acht IPs ohne *bandshift*. Für die Immunoprecipitation wurden *MACS®MicroBeads anti-HA* (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach) verwendet, die Waschungen erfolgten unter sehr milden und nativen Bedingungen. Die selektierten Oligonukleotide wurden in pCR II TOPO kloniert und sequenziert.

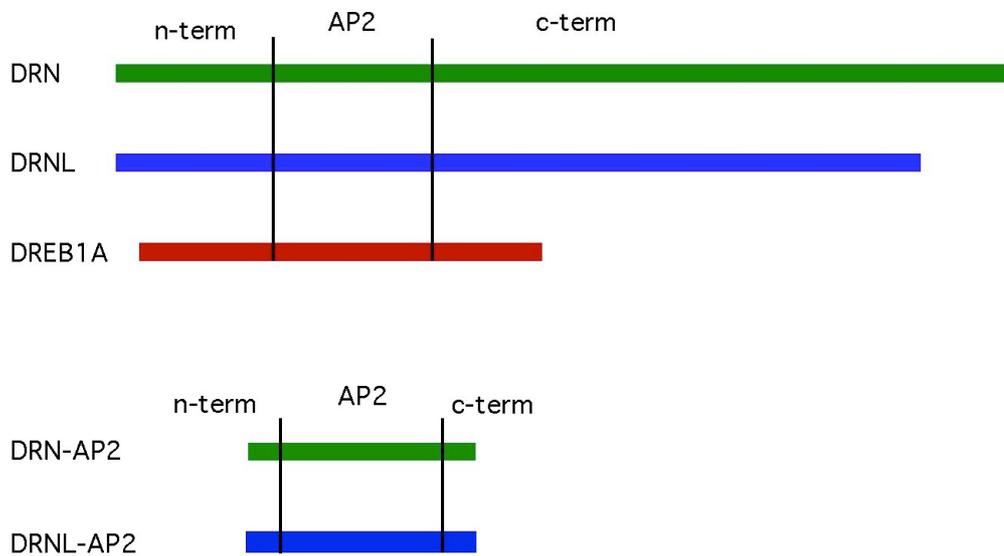
## 2.3 Erzeugte Klone und transgene Pflanzenlinien

### 2.3.1 DRNL Reportergen-Linien in pGPTV



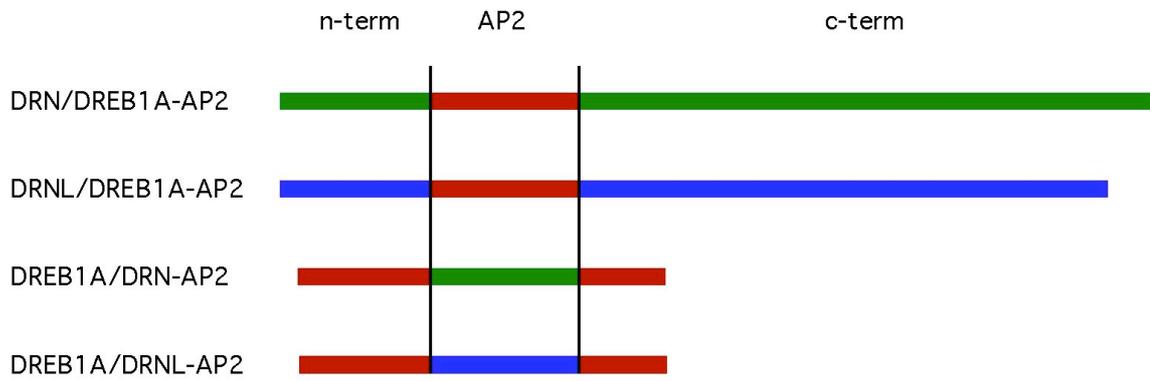
### 2.3.2 Konstrukte zur *in vitro* Proteinexpression in pVEX 2.5d/2.6d

DRN, DRNL und DREB1A

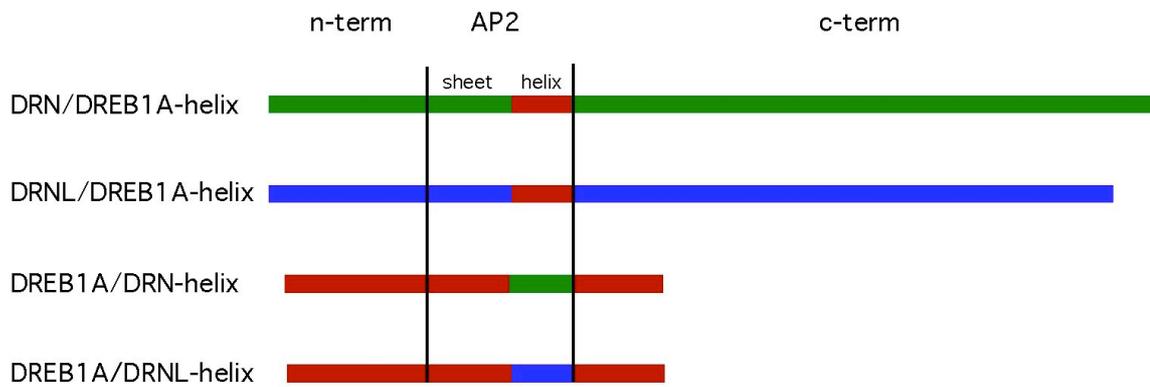


## Chimäre DRN, DRNL und DREB1A

### Austausch der AP2-Domäne



### Austausch der $\alpha$ -Helix der AP2-Domäne



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Expression von *Dornröschen-like* in *Arabidopsis thaliana*

Zur Analyse der Promotoraktivität wurden verschiedene transgene Pflanzenlinien in *Arabidopsis* generiert, die unterschiedliche Reportergene unter dem *Dornröschen-like*-Promotor exprimieren. Zum einen wurden translationale Promotorkonstrukte erzeugt, in der die genomische Sequenz von 5,6 KB *upstream* und 3,8 KB *downstream* des *DRNL*-Transkriptionsstarts, jeweils bis zum nächsten bekannten kodierenden Bereich, ein *DRNL*-CFP Fusionsprotein treibt. In transkriptionalen Linien treibt dieser genomische Bereich, im folgenden als *DRNL*-Promotor (*pDRNL*) bezeichnet, das Reportergen *erGFP*. Die Analyse von jeweils 10 unabhängigen Linien ergab stets identische Muster.

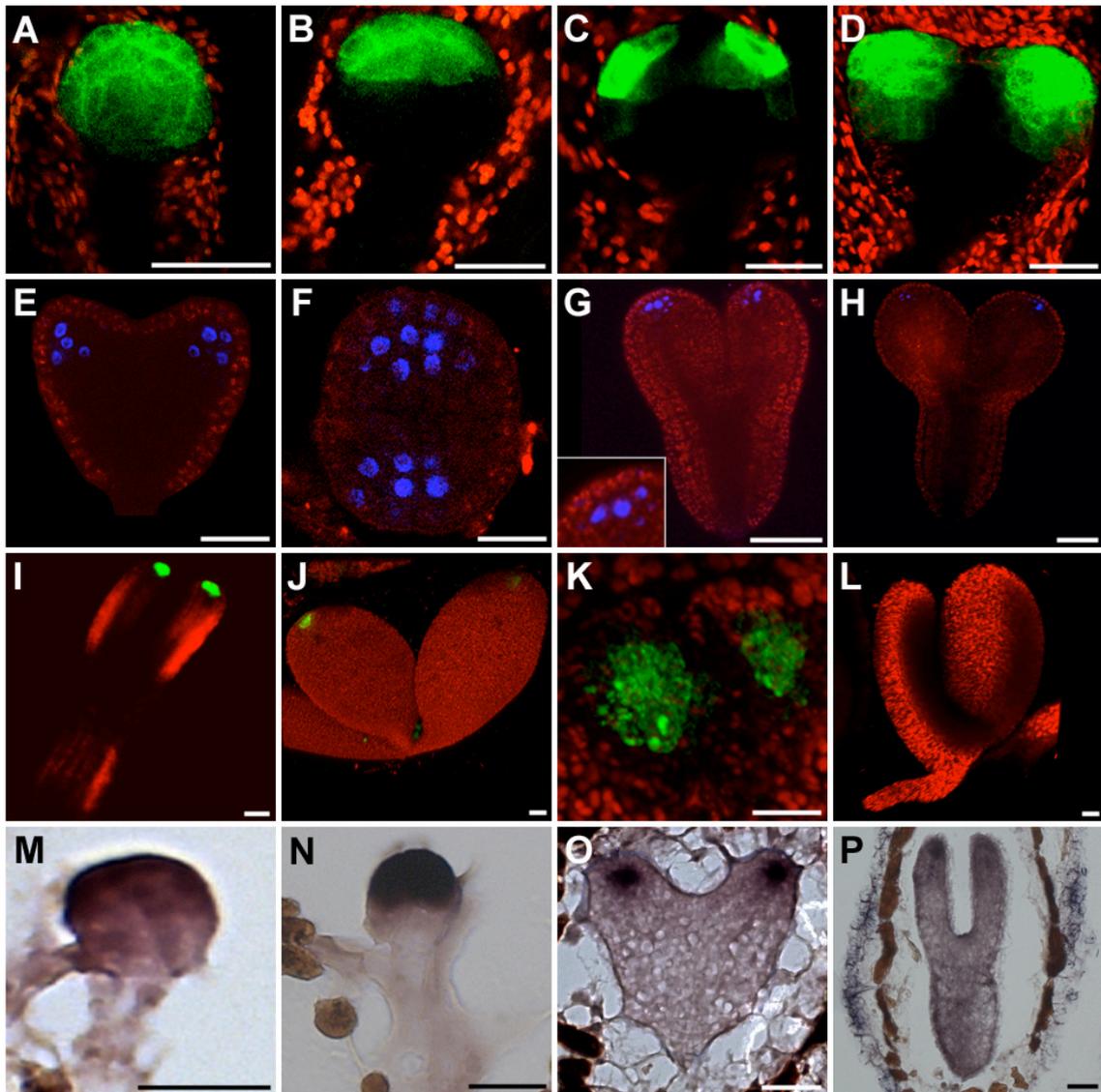
Des Weiteren wurde die Transkription von *DRNL* im Embryo und der Infloreszenz durch *RNA in situ Hybridisierung* analysiert. Auch der Vergleich von *RNA* zu Protein Lokalisierung ergab kaum Divergenz, *DRNL* wirkt also zell-autonom und wird nicht sekretiert.

#### 3.1.1 *DRNL* wird während der gesamten Embryogenese exprimiert

Der *DRNL*-Promotor ist bereits zu einem frühen Stadium der Embryogenese aktiv. Ab dem 16/32-Zellstadium wird *DRNL* im Proembryo exprimiert, wohin gegen Hypophyse und Suspensor keine Promotoraktivität zeigen (Abb. 1A.). Im späteren Globulärstadium ist die *DRNL*-Expression auf den apikalen Bereich begrenzt (Abb. 1B) und teilt sich schließlich im Dermatogenstadium in zwei distinkte Signale an den Seiten (Abb. 1C, G). Ab diesem Zeitpunkt ist der Promotor ausschließlich in den Kotyledonenprimordien aktiv. Im Herzstadium ist die Expression noch vergleichsweise weitläufig in drei bis vier Zellschichten in den kompletten auswachsenden Keimblättern zu beobachten (Abb. 1D-F, J). In späteren Stadien beschränkt sich die Expression auf wenige Zellen in den Spitzen der Kotyledonen, jedoch zu keinem Zeitpunkt in der L1-Schicht (Abb. 1G-H). Zum Ende des Torpedostadiums werden die ersten Blattprimordien angelegt, in denen der Promotor auch starke und zunächst weitläufige Expression in allen Zellen, die histologisch der Organanlage zugeordnet werden können (Abb. 1J). Die beiden ersten Blätter werden distich angelegt und stehen sich damit direkt gegenüber, allerdings werden sie zeitlich versetzt initiiert (Abb. 1K).

Die Muster der *RNA in situ Hybridisierung* (Abb. 1M-P) stimmen mit den Expressionsmustern der translationalen und transkriptionalen Linien weitestgehend überein. Einzig in Herz- und Torpedostadium ist das Muster aller analysierten, transkriptionalen

Linien (Abb. 1D, I) im Vergleich zu den translationalen Linien (Abb. 1E-H) deutlich breiter. Der Ausschluss von DRNL aus der L1-Schicht der entstehenden Kotyledonenprimordien wird in der transkriptionalen Linie nicht beobachtet, was zum einen durch die große Signalstärke des erGFPs zu erklären ist, welches möglicherweise noch in benachbarte Zellen strahlt. Außerdem ist *DRNL*-Expression sehr dynamisch, was vermuten lässt, dass das Protein eine geringe Halbwertszeit besitzt und in der Zelle schnell proteolysiert wird, wodurch auch das Fusionsprotein zügig abgebaut würde, die transkriptionale erGFP Fusion hingegen vergleichsweise langsam proteolysiert wird und das Fluorophor zunächst akkumuliert. Mit Hilfe eines *PESTfind analysis* Programms (Néron et al., 2009) konnten in DRNL tatsächlich fünf Sequenzbereiche lokalisiert werden, die als mögliche PEST-Motive dienen. PEST-Sequenzen bestehen zu einem hohen lokalem Anteil aus Prolin- (P), Glutaminsäure- (E), Serin- (S) und Threoninresten (T) und reduzieren die Halbwertszeit von Proteinen dramatisch, durch die Markierung eines Proteins für den raschen proteolytischen Abbau (Rogers et al., 1986; Rechsteiner and Rogers, 1996).



**Abbildung 1:** Expression von *DRNL* Transkript und Protein während der Embryogenese. Expressionsmuster von *pDRNL::erGFP* (A-D;I-L) und *pDRNL::DRNL-CFP* (E-H) und *in situ* Hybridisierung (M-P) im frühen Globulär- (A,M), späten Globulär- (B,N), Dermatogen- (C), Herz- (D,O) und Torpedostadium (G-I,P). Auf- und Seitenansicht eines Herzstadium Embryos (E,F). Reifer Embryo mit bereits auswachsenden Primärblättern (J) und Detailaufnahme von Blatt 1 und 2 (1K). Homozygote *pDRNL::erGFP*-Linie in der *mp* Verlustmutante. Der Messbalken entspricht 10 $\mu$ m.

Da die Transkription von *DRN* in der Spitze von Kotyledonen in späten embryonalen Stadien bereits, als direkt durch *AUXIN RESPONSE FACTOR 5* (*ARF5*)/*MONOPTEROS* (*MP*) reguliert, identifiziert wurde (Okushima et al., 2005; Cole et al., 2009), sollte auch eine mögliche Verknüpfung von *MP* und *DRNL* analysiert werden. Dazu wurden *pDRNL::erGFP* Linien in die *arf5-1* T-DNA Mutante (Okushima et al., 2005) aus der SALK Kollektion gekreuzt. Die *mp* Mutation ist homozygot letal, weshalb *mp* heterozygote und *pDRNL::erGFP* homozygote Linien ausgewertet wurden. Homozygot mutante Embryonen sind ab dem Torpedostadium morphologisch identifizierbar. Sie entwickeln kein provaskuläres System in der basalen Domäne (Berleth and Jurgens, 1993; Przemeck et al., 1996; Hardtke and Berleth, 1998), wodurch weder Hypokotyl, noch Primärwurzel gebildet werden, die beide im Wildtyp aus diesem Bereich

entstehen. In Embryonen mit offensichtlich basalem Defekt wurde keine *DRNL*-Expression detektiert (Abb. 1L). Außerdem weist auch ein Teil der nicht phänotypischen Embryonen in verschiedenen Stadien keine Expression auf (nicht dargestellt). *DRNL* scheint also in der homozygoten *mp* Mutante zu keinem Zeitpunkt exprimiert zu werden. Im Vergleich dazu wurde für *DRN* nur ein verändertes Muster für phänotypisch mutante Embryonen beobachtet. Pflanzen mit basalem Defekt zeigten keine *DRN*-Expression in den Kotyledonenspitzen, die Expression im SAM hingegen ist nicht beeinflusst (Cole et al., 2009).

### 3.1.2 *DRNL* wird während der Organogenese von Blättern exprimiert

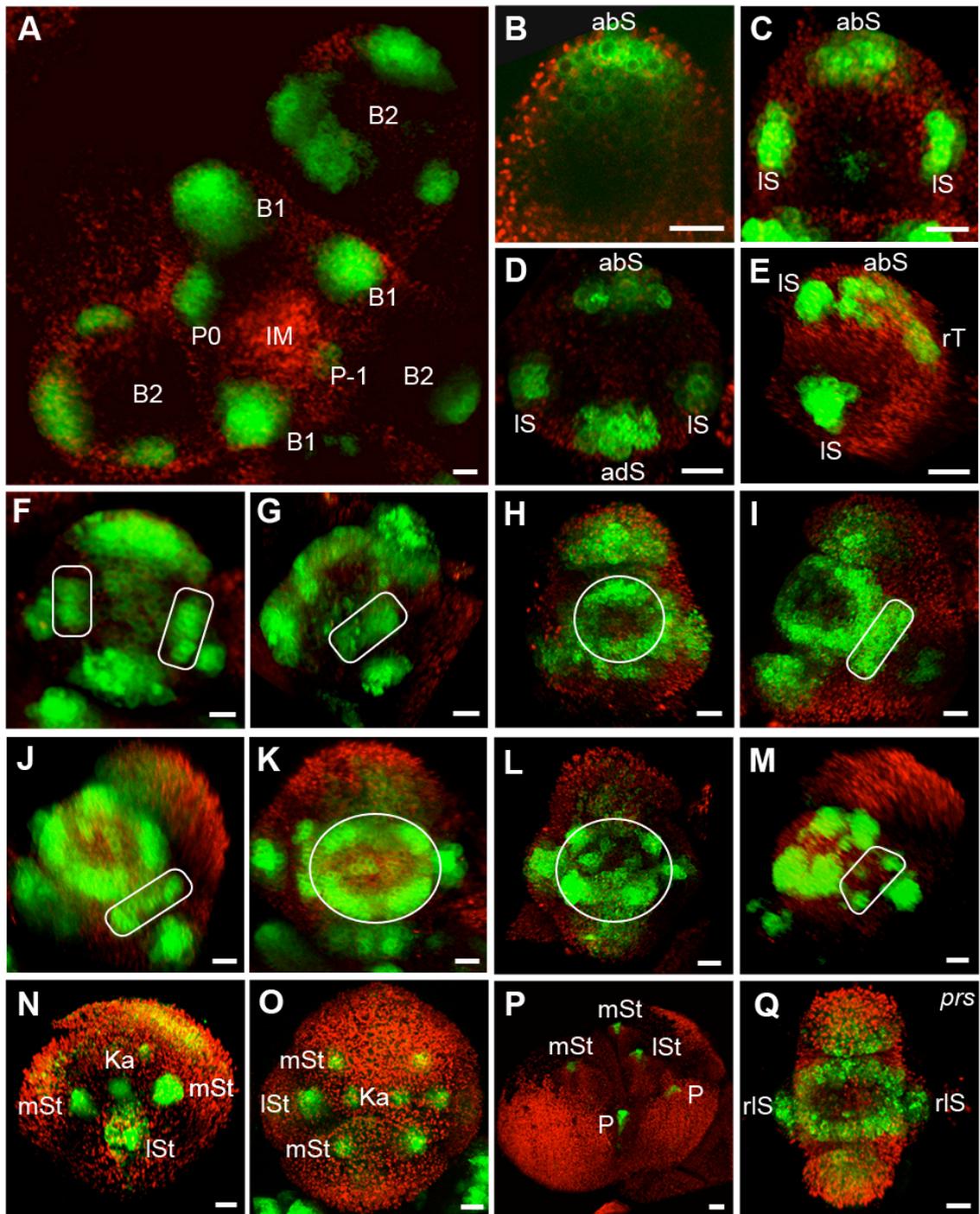
Die bereits in der Ovule angelegten Blattprimordien wachsen nach der Keimung weiter aus, wobei der *DRNL*-Promotor in dem gesamten, histologisch dem Blatt zugehörigen Bereich aktiv ist (Abb. 2A). Während das Blatt elongiert, beschränkt sich die Expression von *DRNL* immer mehr auf den apikalen Teil des jungen Blattes (Abb. 2B) und die Stipulen (Abb. 2C). Schließlich findet sich Expression nur noch in wenigen Zellen der L2 und L3 Schicht (Abb. 2D), analog zu den sich entwickelnden Kotyledonenprimordien. Auch die Folgeblätter zeigen *DRNL*-Promotoraktivität, vergleichbar zu den Primärblättern (Abb. 2E, F). Diese werden in Gegensatz zu Blatt 1 und 2 nicht distich initiiert, sondern in der für *Arabidopsis* ab dem dritten Blatt typischen spiraligen Anordnung. Außerdem ist ein starkes Signal in den Hydatoden junger Blätter zu beobachten (Abb. E, F).

Sowohl *DRNL*, als auch *DRN* werden in den Stipulen ubiquitär exprimiert (Abb. 2C). Um die Expression der beiden Gene während der Initialisierung und dem Auswachsen lateraler Organe aus dem vegetativen Sam besser verfolgen zu können, wurde die transkriptionale Reportergen-Linie *pDRNL::erGFP* in den *pressed flower1* (*prs*) Hintergrund gekreuzt. *PRSI/WOX3* besitzt eine wichtige Funktion bei der Entwicklung lateraler Pflanzenorgane, wie den Stipulen und den lateralen Sepalen (Matsumoto and Okada, 2001; Nardmann et al., 2004). Bezüglich der lateralen Sepalen konnte gezeigt werden, dass die Organe in der Mutante zwar initiiert werden, ein vollständiges Auswachsen jedoch nicht stattfindet. In der *prs* Mutante konnte kein Signal an Stellen, an denen die Stipulen lokalisiert sind, bzw. diese initiiert werden, detektiert werden. Im Gegensatz zu den lateralen Sepalen werden in der Mutante anscheinend keine Zellen für die Bildung von Stipulenanlagen rekrutiert. Konträr zu *DRNL* wird *DRN* nur im Zentrum des Meristems exprimiert (nicht dargestellt).



Im IM zeigt der *DRNL*-Promotor keine Aktivität, analog zum embryonalen und vegetativen Meristem, in denen *DRNL* auch nicht exprimiert wird. Expression findet sich in den Blütenanlagen bereits zu einem Zeitpunkt, an dem es noch keine morphologischen Anzeichen für ein Primordium gibt, dem P-1 und P0 Stadium (Abb. 3A). In Blütenstadium 1, welches sich als Auswölbung in der Peripherie der Apex definiert, ist *DRNL* in dem kompletten, sich auswölbendem Blütenprimordium exprimiert (Abb. 3A), und begrenzt sich schließlich im frühen Stadium 2 auf die abaxiale Seite des Blütenprimordiums (Abb. 3B), wo die abaxiale Sepale entsteht. Zu diesem Zeitpunkt trennt eine Furche bereits die entstehende Blüte vom IM. Kurz darauf zeigt sich Expression zunächst beidseitig an lateraler Position und schließlich adaxial (Abb. 3C). Gegen Ende des Stadiums 2 findet sich *DRNL*-Expression an der Position aller vier Sepalen, wobei die adaxiale Sepale näher an den lateralen Sepalen liegt, als die abaxiale (Abb. 3D). Das abaxiale Signal trennt sich während des Blütenstadiums 2 vertikal in zwei distinkte Signale auf (Abb. 3E). Zwischen dem FM und dem Sepalenwirtel sind ab dem späten Stadium 2 lateral außerdem noch zwei sichelförmige Felder zu erkennen, an einer Position, an der zu einem späteren Zeitpunkt die Petalen entstehen (Abb. 3F). Außerdem lässt sich im Zentrum der Stadium 2 Blüte in wenigen Zellen der L1 schwache Promotoraktivität detektieren (Abb. 3F). Diese Zellen wurden möglicherweise bereits zu diesem Zeitpunkt als Vorläuferzellen für die Stamenanlagen rekrutiert. Während die Sepalen ab Stadium 3 beginnen auszuwachsen, und die Expression sich auf die Spitzen der Sepalen begrenzt, zeigt sich zentrumsnah eine ringförmige Expressionsdomäne, die das FM umschließt (Abb. 3G-I). Im späten Stadium 4 teilen sich sowohl dieser Ring, als auch die beiden sichelförmigen Felder in mehrere einzelne Signale auf. Der Ring spaltet sich in vier Signale auf, die positional mit den medialen Staubblättern übereinstimmen. Die sichelförmigen Expressionsdomänen trennen sich in jeweils drei Signale, wobei das mittige Signal mehr apikal positioniert ist, als die beiden äußeren (Abb. 3J, 4M). Die äußeren Domänen markieren die später entstehenden Petalen vor, das mittlere Signal markiert das laterale Staubblatt, das zu diesem Zeitpunkt zwischen den Petalen und den mediale Stamen initiiert wird. Im Zentrum, wo auch das FM lokalisiert ist, zeigen sich zu diesem Zeitpunkt zwei, zunächst leicht diffuse Signale (Abb. 3K), die in Stadium 5 deutlich die beiden Karpell-Primordien vormarkieren (Abb. 3L). Gleichzeitig wird *DRNL* stark in den auswachsenden, medialen und laterale Stamen exprimiert (Abb. 3M). In allen Sepalen ist der Promotor nur noch sehr schwach in den Spitzen aktiv und verschwindet dann endgültig. Die abaxiale Sepale wächst am schnellsten, und zeigt schon ab Stadium 5 kaum mehr *DRNL*-Expression. Zu diesem Zeitpunkt sind die beiden lateralen Sepalen noch sehr klein. In ihren Spitzen lässt sich noch bis in Stadium 6 Promotoraktivität detektieren. Die Petalen zeigen in Stadium 5 und 6 kaum *DRNL*-Expression. Erst in Stadium 8 bis 9, wenn die Blütenblätter beginnen auszuwachsen findet sich ein Maximum in den Spitzen. In diesem Stadium findet sich außerdem noch

ein Expressionsmaximum in den Spitzen aller Stamen (Abb. 3P). In den lateralen Sepalanlagen von Blüten der *prs* Mutante zeigt sich ein deutliches Expressionsmaximum, obwohl diese Mutante keine lateralen Sepalen bildet (Matsumoto and Okada, 2001; Nardmann et al., 2004). Der *DRNL*-Promotor ist, wie in wildtypischen Pflanzen schon ab Blütenstadium 2 an den Positionen, an denen die lateralen Sepalen angelegt werden aktiv (nicht dargestellt). Expression an diesen Positionen lässt sich bis zu Stadium 5 oder 6 detektieren (Abb. 3Q, Blütenstadium 4), ohne dass die lateralen Sepalen deutlich elongieren. *DRNL*-Expression korreliert dabei offensichtlich mit sehr frühen Stadien der Organinitiierung, unabhängig der Organogenese.

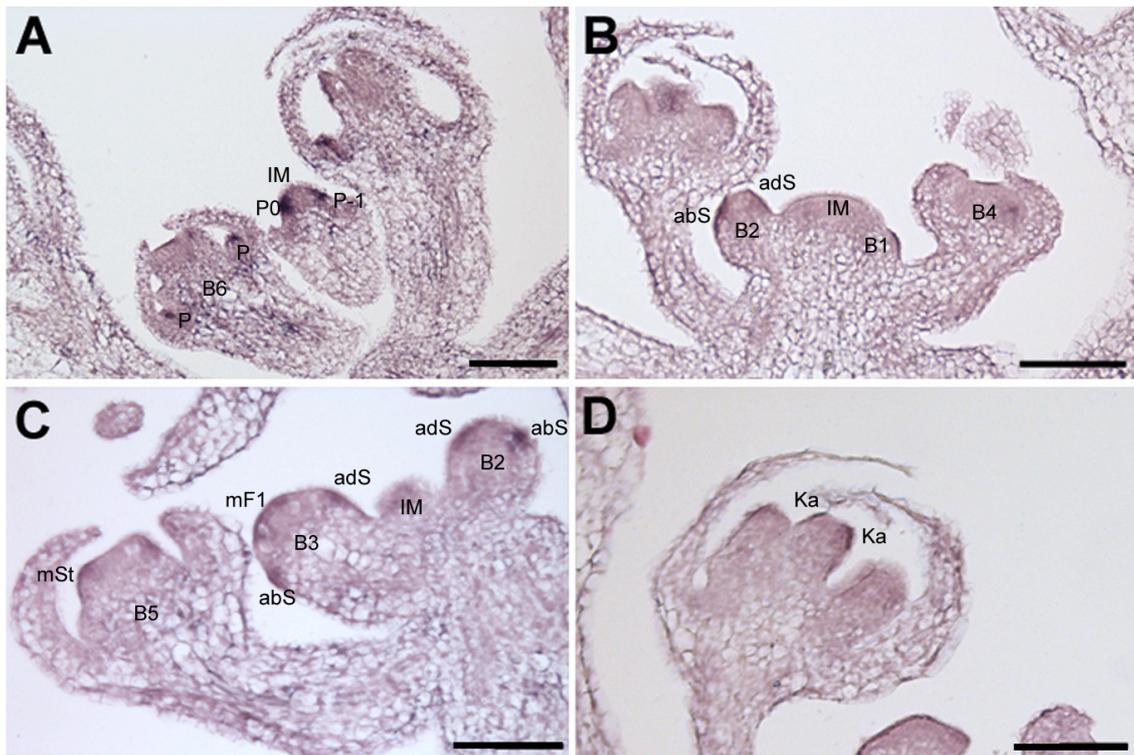


**Abbildung 3:** Expression von *DRNL* während der floralen Entwicklung.

Expressionsmuster von *pDRNL::erGFP* im IM und FM von Stadium 1-9 (nach *Bowman and Smyth, 1990*). Aufsicht auf ein IM mit Blütenprimordien bis Stadium 2 (A) und einzelne Blüten in frühem (B), mittlerem (C,D,E) und spätem (F) Stadium 2, Stadium 3 Blüte (G), frühe (H,I) und späte (J,K) Stadium 4 Blüthen, Stadium 5 Blüte (L,M), Stadium 6 Blüte (N,O) und Stadium 8-9 Blüte (P). Stadium 4 Blüte einer *prs* Mutante (Q). Die Blütenprimordien werden als laterale Ansicht (E,G,I,J,M,N,P) und Aufsicht (B,C,D,F,H,K,L,O,Q) gezeigt. Abkürzungen: Infloreszenzmeristem (IM), florale Primordien (P-1,P0,P1), Blütenstadium (B1,B2), abaxiale Sepale (abS), laterale Sepale (IS), adaxiale Sepale (adS), rudimentäres Tragblatt (rT), laterales Stamen (lSt), mediales Stamen (mSt), Karpell (Ka), Petale (P), rudimentäre laterale Sepale (rIS). Die weißen eckigen Umrandungen umschließen die morphogenen Felder, welche die lateralen Sepalen und die Petalen vormustern. Das ringförmige Feld welches die medialen Stamen vormustert, ist durch die weißen runden Umrandungen gekennzeichnet. Der Messbalken entspricht 10µm.

Es wurde weiter beobachtet, dass *DRNL* in einzelnen Organen zeitweise nicht oder nur äußerst schwach exprimiert wird. Besonders auffällig sind die Petalen, die sehr früh in der Organogenese angelegt werden, und zu dem Zeitpunkt ein deutliches Signal zeigen, dann jedoch über einen längeren Zeitraum bezüglich ihrer Entwicklung arretiert sind bzw. nur sehr langsam wachsen, und *DRNL*-Promotoraktivität in Stadium 6 und 7 kaum detektiert werden kann. Sobald die Petalen in Stadium 9 beginnen zu elongieren, ist wieder ein deutliches Signal zu finden. *DRNL* scheint also in der Blüte an der Regulation eines zweistufigen Prozesses beteiligt zu sein. Zum einen werden alle floralen Organanlagen vormarkiert lange bevor sie morphologisch erkennbar sind, zum anderen besitzt *DRNL* weiterhin eine Funktion bei der Organogenese. Während der frühen Phase, wenn die Primordien initiiert werden, ist die *DRNL*-Expression auf die L1- und L2-Schicht begrenzt. Im weiteren Verlauf des Auswachsens und der Differenzierung der Organe lässt sich auch Expression in tieferen Gewebeschichten, besonders deutlich zu erkennen anhand der Sepalenentwicklung, detektieren.

Der Vergleich von Transkription zu den Promotorkonstrukten zeigt auch in der Infloreszenz keinerlei Abweichungen. Die Interpretation der RNA-Muster ist aufgrund der Komplexität des *DRNL*-Expressionsmuster deutlich erschwert, verglichen mit den Animationen, weshalb sie hauptsächlich zur Kontrolle dienen, ob der gewählte Promotorbereich, der die Reportergene treibt, ein zur RNA-Verteilung vergleichbares Muster aufweist. Die Analyse der RNA-Muster mittels *in situ Hybridisierung* zeigte ebenfalls, dass *DRNL* nicht im IM exprimiert wird, dafür aber in noch nicht morphologisch sichtbaren Primordien der Stadien P-1 und P0 (Abb. 4A). In Stadium 1 lässt sich *DRNL*-Transkript in dem sich auswölbendem Primordium nachweisen (Abb. 4B) und ab Stadium 2 werden deutlich die beiden medialen Sepalen markiert (Abb. 4B, C). Außerdem kann *DRNL*-RNA in einer sehr frühen Stadium 3 Blüte apikal in der L1 detektiert werden (Abb.4C). Die Schnittebene ist anscheinend nicht direkt mittig, sondern lateral verschoben, wodurch das morphogene Feld, welches die Petalen und ein laterales Stamen vormustert, zu erkennen ist. In einer Stadium 6 Blüte findet sich Transkript in den Petalen (Abb. 4A), in Stadium 5 in den medialen Stamen (Abb.4 C) und in Stadium 6 lässt sich *DRNL* Transkript in den Karpellen nachweisen (Abb. 4D).



**Abbildung 4:** RNA-Verteilung von *DRNL* in verschiedenen Organprimordien. *In situ Hybridisierung* von longitudinalen Schnitten von Infloreszenzen mit einer *DRNL anti-sense* Sonde (A-D). Abkürzungen: Infloreszenzmeristem (IM), florale Primordien (P-1,P0,P1), Blütenstadium (B1,B2,B3,B4,B5), abaxiale Sepale (abS), adaxiale Sepale (adS), mediales Stamen (mSt), Karpell (Ka), Petale (P). Das morphogene Feld, welches die Petalen und lateralen Stamen vormarkiert wurde in dieser Abbildung als morphogenes Feld 1 (mF1) gekennzeichnet. Der Messbalken entspricht 50µm.

Mittels klonarer Sektoranalyse konnte die Mindestanzahl von Gründerzellen, die für die Entstehung einer floralen Organanlage benötigt werden, bestimmt werden (Bossinger and Smyth, 1996). Da *DRNL* in allen inzipienten floralen Organanlagen exprimiert wird, und zwar deutlich bevor diese morphologisch erkennbar sind, wurde vermutet, dass es sich bei den, von *DRNL* vorgemusterten Zellpopulationen um Gründerzellen handelt. Deshalb wurde bestimmt, wie viele Zellen von *DRNL* als jeweilige Organanlage vormarkiert werden, und in welcher Schicht die *DRNL* exprimierenden Zellen lokalisiert sind. Die Zellen wurden zum frühesten Zeitpunkt gezählt, an dem die einzelne Organanlage vormarkiert ist, also für Petale und Stamen auch nachdem sich die morphogenen Felder in einzelne Signale trennen. Die ermittelten Zellzahlen wurden mit den Ergebnissen von Bossinger und Smyth (1996) verglichen. Dabei ergaben sich für alle Organe deutliche Übereinstimmungen mit den Ergebnissen der klonalen Sektoranalysen (Tab 2).

Blütenstadium	Organanlage	Anzahl der <i>DRNL::erGFP</i> - exprimierenden Zellen	Anzahl Gründer- zellen nach Boss- inger und Smyth (1996)
0	Abaxiale Sepale	8 (L1)	8
2	Laterale Sepale	4-8 (L1)	k.A.
2	Adaxiale Sepale	8-10	8
2	Petalenfeld	6-8	k.A.
3	Mediales Stamenfeld	40-50 (L1)	k.A.
4	Mediale Stamen	4 (L1)	4
4	Petale	2-4	2
4	Laterale Stamen	2-4	k.A.
5	Karpelle	8 L1	8

**Tabelle 2:** Vergleich der durch *pDRNL::erGFP* markierten Zellen mit Gründerzellen floraler Organe. Abkürzungen: keine Angaben (k.A.)

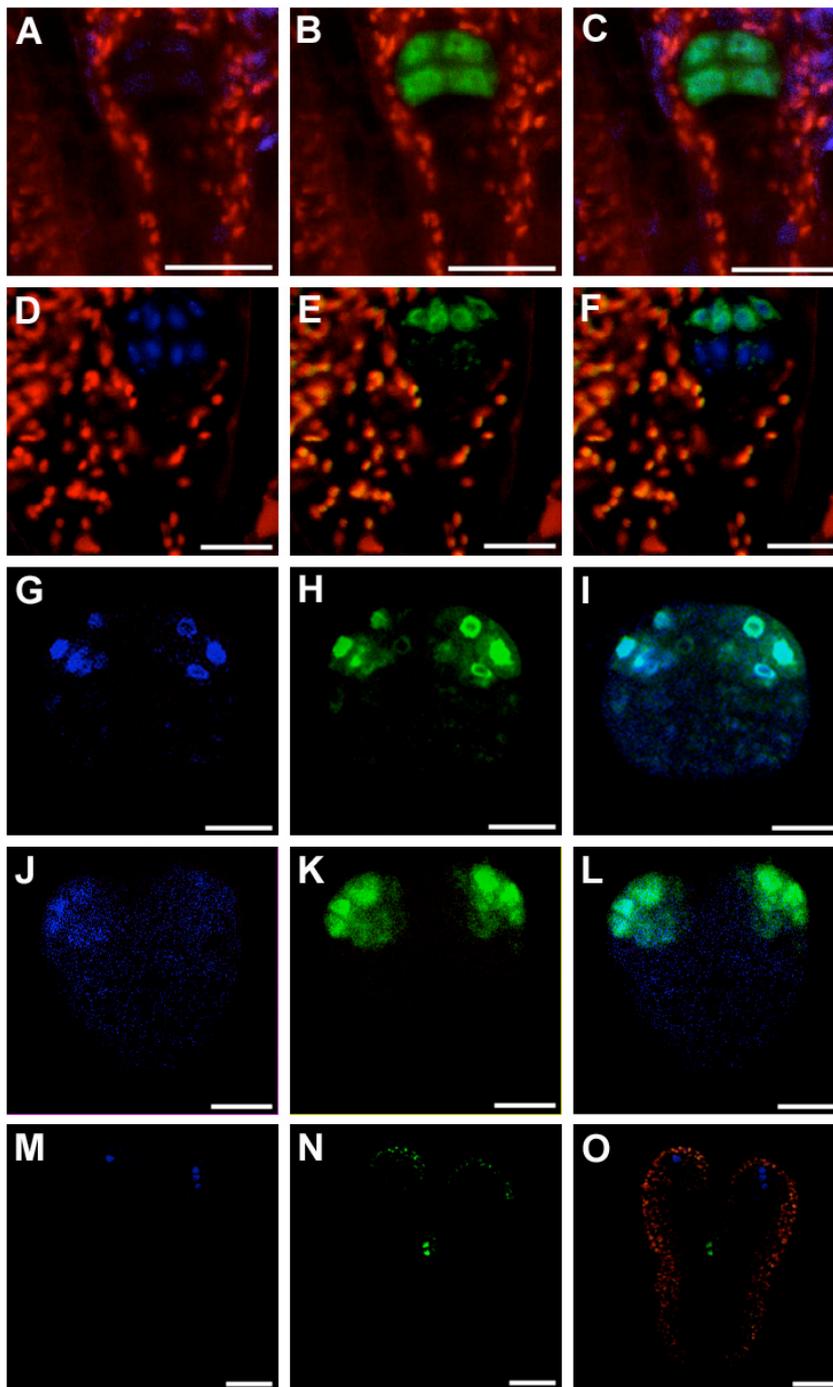
### 3.1.4 DRNL und DRN besitzen teilweise überlappende Expressionsdomänen

Um das Expressionsmuster von *DRNL* mit *DRN* unmittelbar vergleichen zu können, wurde die translationale Fusion *pDRNL::DRNL-CFP* mit einer *pDRN::DRN-GFP* Reporterger-Linie gekreuzt. Da die *pDRNL::DRNL-CFP* Linien zu schwach waren, um Expressionsmuster in der Infloreszenz zu beobachten, wurden außerdem doppelt transgene Linien mit *pDRN:H3GFP* und *pDRNL::erGFP* erzeugt.

Die beobachteten Expressionsmuster von *DRN* und *DRNL* decken sich weitestgehend mit bereits bekannten Mustern der beiden Promotoren. Allerdings konnte die Promotoraktivität der beiden Gene mit Hilfe der verwendeten Reportergene in den doppelt-transgenen Pflanzenlinien sehr detailliert beobachtet werden, mit dem Ergebnis, dass die beiden Expressionsmuster divergenter sind, als bisher angenommen (Kirch et al., 2003; Ikeda et al., 2006; Marsch-Martinez et al., 2006; Nag et al., 2007)

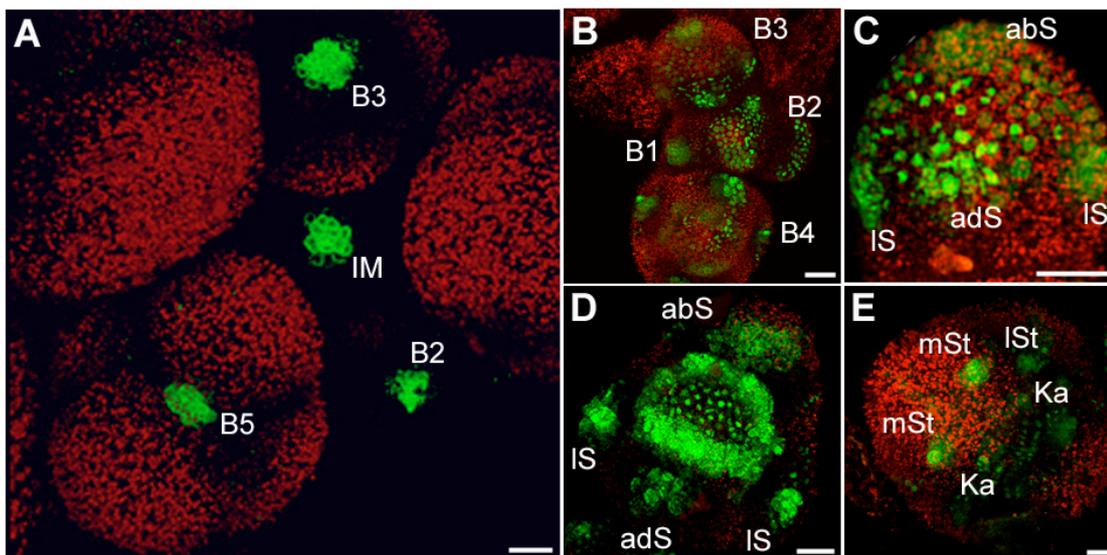
*DRN* wird bereits zu einem früheren Zeitpunkt als *DRNL* im Embryo exprimiert. Der Promotor zeigt schon nach der ersten Teilung, in apikale und basale Zelle, Aktivität in der apikalen Zelle (Cole et al., 2009). In den doppelt transgenen Pflanzenlinien lässt sich beobachten, dass der *DRN*-Promotor bereits zu einem früheren Zeitpunkt aktiv ist (Abb. 5A-C). Außerdem ist die *DRN*-Expression schon zu einen Zeitpunkt auf den apikalen Bereich des Embryos beschränkt, an dem der *DRNL*-Promotor noch im kompletten Proembryo aktiv ist (Abb. 5D-F). In Dermatogen- und Herzstadium sind beide Gene in den selben Zellen exprimiert (Abb. 5G-L). Besonders deutlich werden die divergen-

ten Expressionsmuster dann ab dem Torpedostadium, wenn *DRN* in der L1-Schicht der Kötyledonenprimordien und dem SAM exprimiert wird (Abb. 5N-O).



**Abbildung 5:** Vergleich der *DRNL* und *DRN* Expression während der Embryogenese. Konfokale Serien doppelt transgener *pDRNL::DRNL-CFP*, *pDRN::DRN-GFP* als Einzelaufnahme und Überlagerung, im frühen (A-C) und späten Globulär- (D-F), Dermatogen (G-I), Herz- (J-L) und Torpedostadium (M-O). Der Messbalken entspricht 10 $\mu$ m.

Der *DRN*-Promotor ist im Zentrum der Infloreszenz, wo das IM lokalisiert ist sehr aktiv, in den Blütenprimordien der Stadien 0 und 1 lässt sich jedoch keine Expression detektieren. Das Signal erscheint erst wieder in der Stadium-2-Blüte, wenn das Primordium bereits durch eine Furche vom Apex getrennt ist und ist dort bis zum Ende von Blütenstadium 5 detektierbar (Abb. 6A, B). Im frühen Stadium 2 wird *DRN* abaxial exprimiert und überlappt an dieser Position teilweise mit *DRNL* (Abb. 6B). Die Expressionsdomäne von *DRN* verlagert sich noch während dieses Stadiums ins Zentrum des Blütenprimordiums, wo sie erneut mit *DRNL* überlappt, welches zu diesem Zeitpunkt die adaxiale Sepale markiert (Abb. 6C). In Stadium 4 und 5 kommt es ebenfalls zu Überschneidung mit *DRNL*, erst mit dem morphogenen Feld, welches die Stamenprimordien vor-markiert (Abb. 6D), später bei der Initiierung der Karpellanlagen (Abb. 6E). Ab Stadium 6, wenn bereits alle Organprimordien morphologisch erkennbar sind, lässt sich keine *DRN*-Expression mehr detektieren.



**Abbildung 6:** Vergleich der *DRN* und *DRNL* Expression während der floralen Entwicklung. Expression von *pDRN::erGFP* in der Infloreszenz (A). Expressionsmuster doppelt transgener *pDRNL::erGFP*, *pDRN::H3-GFP* Reporterger-Linien in der Infloreszenz (B) und Blüten in Stadium 2 (C), 4 (D) und 6 (E). Dabei stammen die kleinen punktförmigen Signale von dem kernlokalisierten H3-GFP (*DRN*), die größeren, teilweise ringförmigen basieren auf *erGFP* (*DRNL*). Abkürzungen: Infloreszenzmeristem (IM), Blütenstadium (B1,B2,B3,B4,B5), abaxiale Sepale (abS), laterale Sepale (IS), adaxiale Sepale (adS) laterales Stamen (lSt), mediales Stamen (mSt), Karpell (Ka). Der Messbalken entspricht 10µm.

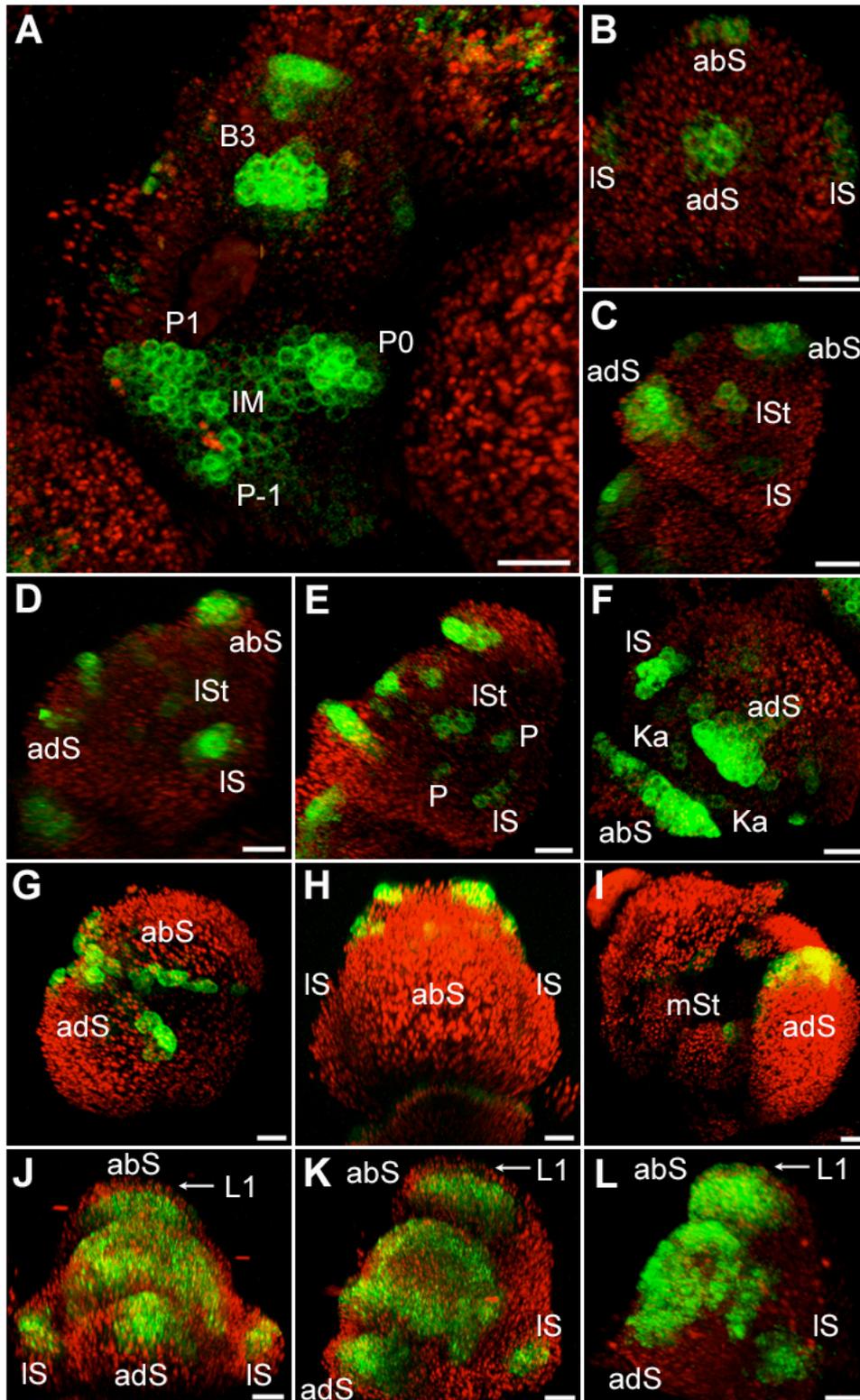
*Kirch et al.* zeigten ein weitestgehend überlappendes RNA-Muster von *DRN* und *DRNL* in Infloreszenzen, mit *DRN* Expression in den Sepalen, Stamen- und Karpellen (*Kirch et al.*, 2003). *Nag et al.* konnten mittels *RNA in situ Hybridisierung* und *pDRNL::GUS* Reporterlinien ähnliche Expressionsmuster für *DRNL* in den Blütenprimordien und in verschiedenen Stadien in allen Organanlagen zeigen. Dabei wurde allerdings auch ein Maximum im gesamten IM durch alle drei Zellschichten beobachtet. Der Vergleich mit

den hier gezeigten Expressionsmustern von *DRNL* und *DRN* legt die Vermutung nahe, dass es bei beiden *in situ Hybridisierungen* zur Kreuzhybridisierung der Sonde mit *DRN* bzw. *DRNL* oder anderen Transkripten kam, da es nach den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente keinerlei Indiz dafür gibt, dass Promotoraktivität, RNA- und Proteinlokalisierung von einander abweichen. Expression von *DRNL* im Gynoeceums während der Ovulenenwicklung (Nag et al., 2007) konnte ebenfalls nicht beobachtet werden, allerdings wird *DRN* in den Ovulenprimordien exprimiert (Kirch et al., 2003), was ebenfalls auch eine Kreuzhybridisierung der Sonde deutet.

### **3.1.5 Lokalen Auxin-Maxima erscheinen in floralen Organanlagen zeitlich versetzt im Vergleich zur *DRNL*-Expression**

Um die Expressionsmuster von *DRN* und *DRNL* in Relation zu Auxinverteilung zu beurteilen, wurde der synthetische *DR5*-Promotor verwendet, und die *DR5:erGFP* Expression analysiert. Dafür, wurden ebenfalls *z-stacks* durch die Infloreszenz aufgenommen und daraus eine 3-D-Animation erstellt.

Die Expressionsdomäne erstreckt sich über alle initiierten Blütenanlagen der Stadien P-1 bis P1 (Abb. 7A), und überlappt so in den entstehenden Blütenanlagen mit *DRNL*. Während der weiteren Blütenentwicklung finden sich auch in den einzelnen Organanlagen *DR5*-Maxima, jedoch immer zu einem weit späteren Stadium, als *DRNL*-Expression detektiert werden kann (Tab. 3). In Stadium 2 erscheint *DR5*-Signal parallel in allen vier Sepale (Abb. 7B). Kurz darauf beginnen die Sepalenanlagen auszuwachsen. Im Stadium 3 werden als nächstes von *DR5* zusätzlich einige Zellen lateral des FMs markiert (Abb. 7C). An dieser Stelle sind etwas später die lateralen Stamenanlagen lokalisiert. In der Stadium 4 Blüte finden sich Auxin-Maxima in den Spitzen der auswachsenden Sepalen, überlappend mit *DRNL* (Abb. 7D). Des Weiteren zeigen die einzelnen Petalen, die zu diesem Zeitpunkt schon morphologisch erkennbar sind Auxin-Maxima (Abb. 7E). In Stadium 5 markiert *DR5* zwei Maxima im Zentrum des Meristems, wo die Karpellprimordien lokalisiert sind (Abb. 7F), kurz bevor sich das Gynoeceum auswölbt. In den medialen Stamen ist der *DR5*-Promotor erst in Stadium 8 aktiv (Abb. 7I). Während die bereits weitestgehend differenzierten Staubblätter elongieren, zeigt sich ein Signal in den Spitzen, analog zu *DRNL*. In der L1 Schicht der medialen Sepalen ist der *DR5*-Promotor sehr lange aktiv, bis Stadium 8 oder 9, allerdings nicht permanent in allen Zellen (Abb. 7G-I).



**Abbildung 7:** Analyse von Auxin-Maxima während der floralen Entwicklung und die Auswirkung der Mutagenese von vier *AuxREs* im *DRNL*-Promotor (*mut-pDRNL::erGFP*). Expression von *DR5::GFP* in der Infloreszenz (A) und in Blüten der Stadien 2 (B), frühes (C) und spätes Stadium 3 (D), Stadium 4 (E), Stadium 5 (F), Stadium 6 (G,H) und Stadium 8-9 (I). Expression von *mut-pDRNL::erGFP* im Vergleich mit *pDRNL::erGFP* (L) in Blütenstadium 4. Die Blütenprimordien werden als abaxiale (H) oder adaxiale Ansicht (J), laterale Ansicht (C,D,E,G,I) und Aufsicht (B,F) gezeigt. Abkürzungen: Infloreszenzmeristem (IM), florale Primordien (P-1,P0,P1), Blütenstadium (B3), abaxiale Sepale (abS), laterale Sepale (IS), adaxiale Sepale (adS), laterales Stamen (ISt), mediales Stamen (mSt), Karpell (Ka), Petale (P), L1-Schicht (L1). Der Messbalken entspricht 10µm.

*Smyth et al.* erstellten anhand morphologischer Merkmale der Blüten eine detaillierte zeitliche Einteilung der Stadien und konnten damit die genaue Dauer der einzelnen Blütenstadien bestimmen (1990). Anhand dieser Tabelle wurde die zeitliche Differenz zwischen *DRNL*-Expression und *DR5*-Signal während der Blütenentwicklung berechnet (Tab. 3). Teilweise ergaben sich große zeitliche Verzögerungen von bis zu 2-3 Tagen zwischen *DRNL*- und *DR5*-Expression, wie z.B. für die abaxiale und die lateralen Sepalen. Die Sepalen werden von *DRNL* zeitlich versetzt markiert, das *DR5*-Signal erscheint hingegen in allen vier Sepalen parallel zu dem Zeitpunkt, an dem *DRNL* in der adaxialen Sepale detektiert werden kann. Kurz darauf sind alle vier Sepalen auch morphologisch identifizierbar. Während von *DRNL* in Stadium 2 ein morphogenes Feld markiert wird, aus dem später die Petalen und die lateralen Stamen initialisiert werden, zeigt sich die *DR5*-Expression in diesen Organanlagen zeitlich verzögert und sehr lokal an nur in den Zellen, die für die Bildung eines Organprimordiums rekrutiert wurden. In den Stamen konnte, im Gegensatz zu *DRNL*, erst sehr spät im Verlauf der Organogenese ein Auxinmaximum mit Hilfe des *DR5*-Promotors detektiert werden, was vermuten lässt, dass Auxin für die Initialisierung der Staubblätter keinerlei Bedeutung hat, sondern allenfalls für die Differenzierung dieser Organe. Die zeitliche Verzögerung von *DRNL*-Expression zu *DR5*-Signal bezüglich der Karpelle ist gering.

Für *DRNL* ergab sich aus der Analyse der Reportergergenkonstrukte die Beteiligung an einem zweistufigen Prozess. Das Gen ist während der floralen Entwicklung zunächst an der Rekrutierung von Gründerzellen beteiligt, zu einem späteren Zeitpunkt an Wachstum und Differenzierung der Organprimordien. Die indirekte Beobachtung von Auxinmaxima in Blütenanlagen durch den *DR5*-Promotor lässt vermuten, dass Auxin, wenn überhaupt in späte Prozesse der Organogenese involviert ist, und keinerlei Bedeutung für die Initialisierung von Organanlagen hat.

Organanlage	<i>DRNL</i> Signal	<i>DR5</i> Signal	Differenz zwischen <i>DRNL</i> und <i>DR5</i> in h
Abaxiale Sepale	0	2	50
Laterale Sepale	2 (Anfang)	2	10
Adaxiale Sepale	2	2	-
Petalenfeld	2	-	-
Petalen	4	4	-
Laterale Stamen	4	3	18
Mediale Stamenfeld	3	-	-
Mediale Stamen	4	8	60
Karpelle	5 (Anfang)	5 (Ende)	6

**Tabelle 3:** Vergleich der *DRNL*-Expression mit dem Auftauchen lokaler Auxin-Maxima. Die Berechnung der zeitlichen Differenz zwischen *DR5* und *DRNL* erfolgte anhand einer Tabelle von Smyth *et al.* (1990).

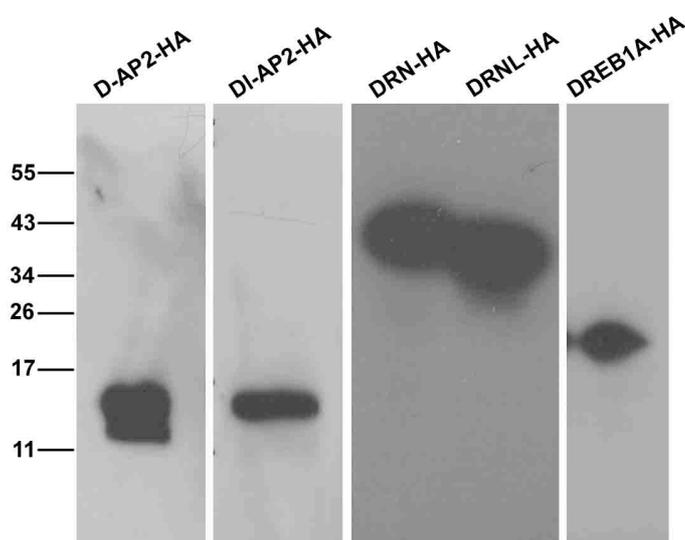
In der Promotorsequenz von *DRNL* konnten vier kanonische *Auxin-responsive Elements* (*AuxREs*) identifiziert werden. Es wurde bereits gezeigt, dass *DRNL* in der *mp* Mutante während der Embryogenese nicht exprimiert wird. Um die Auxin gesteuerte Kontrolle von *DRNL* weiter zu evaluieren, wurden die *AuxREs* im *DRNL*-Promotor mutiert und von dem *mut-pDRNL*-Promotor *erGFP* getrieben. Das Expressionsmuster zeigte allerdings kaum Unterschiede zu der wildtypischen Expression (nicht dargestellt). Einzig in den Blütenprimordien konnte in Stadium 4 beobachtet werden, dass die Expression in der L1-Schicht der medialen Sepalen reduziert ist bzw. komplett verloren geht (Abb. 7J, K), verglichen zur *pDRNL::erGFP* (Abb. 7L).

### 3.2 DNA-Bindestudien mit *DRN* und *DRNL*

Als Mitglieder der DREB/ERF-Familie besitzen *DRN* und *DRNL* eine AP2-Domäne, welche als DNA-bindend charakterisiert wurde. Die Familie wird in fünf Sub-Gruppen aufgeteilt, bezeichnet als AP2, DREB, ERF, RAV und Andere (Sakuma *et al.*, 2002). Mitglieder der DREB-Subfamilie binden an das DRE-Motiv, welches die Sequenz TACCGACAT hat. AP2-Proteine, die der ERF-Subfamilie angehören, binden an eine, als GCC-Box bezeichnete DNA-Sequenz, mit dem Kernmotiv GCCGCC (Sakuma *et al.*, 2002).

### 3.2.1 DRN und DRNL zeigten im *EMSA* keine spezifische Bindung an die GCC-Box

Die direkte Protein-DNA-Interaktion von DRN und DRNL sollte durch *Elektromobility shift assays (EMSA)*, auch *bandshift* genannt, nachgewiesen werden. Dafür wurde sowohl der komplette ORF *in vitro* translatiert, als auch für DRN die isolierte AP2-Domäne (D-AP2). Alle synthetisierten Proteine wurden vor der weiteren Verwendung mittels *Western* bezüglich ihrer Größe überprüft (Abb. 8). Als Bindestelle wurde zunächst die GCC-Box (AGCCGCC) angeboten, da beide Proteine phylogenetisch in Gruppe B1 eingeteilt werden, zu der auch ERF3 und ERF4 gehören, die nachweislich an die GCC-Box bindet (Ohme-Takagi, 2000).



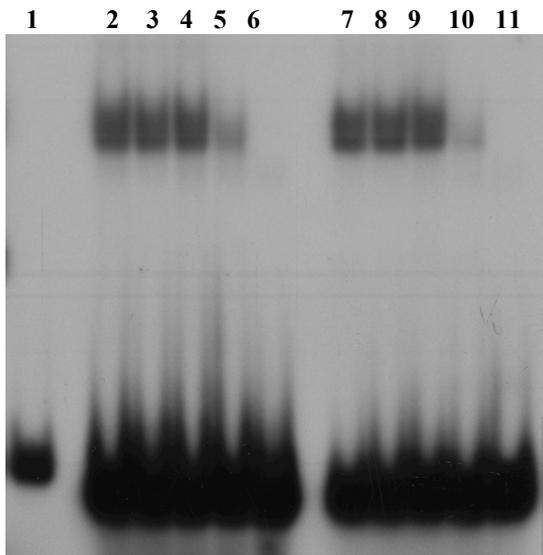
**Abbildung 8:** Kontrolle der *in vitro* translatierten Proteine D-AP2, DL-AP2, DRN, DRNL und DREB1A mittels *Western* mit anti-HA-Antikörper (Roche, Klon 3F10)

Zunächst wurden die verwendeten Proteine mit einem *in vitro* Transkriptions-Translations-System auf bakterieller Basis (*E. coli*-Extrakt) synthetisiert. Tatsächlich konnte bei den durchgeführten *EMSA* eine starke Bande detektiert werden, sowohl für DRN, als auch DRN-AP2 in Kombination mit dem wGCC-Motiv. Bei der Durchführung diverser Kontrollen stellte sich jedoch schnell heraus, dass es sich um einen unspezifischen Komplex handelte, der auch bei der Verwendung eines Oligonukleotids mit mutierter Bindestelle (mGCC) mit dem Motiv CCTCCT auftrat (Abb. 9).



**Abbildung 9:** EMSA mit DRN (2,4) und D-AP2 (3,5) und wGCC (2,3) oder mGCC (4,5), als Kontrolle wGCC ohne Protein (1).

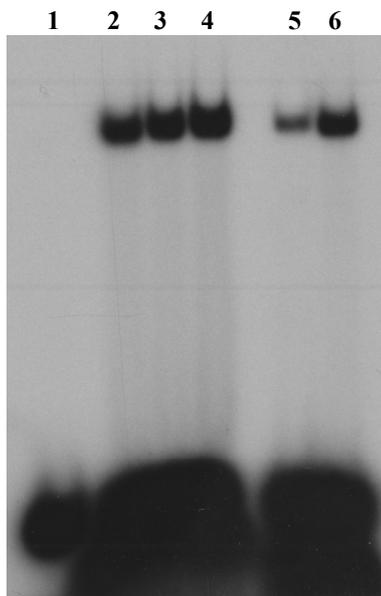
Des Weiteren reagierte der beobachtete Komplex auf spezifische Konkurrenz mit dem nicht radioaktiv-markierten Oligonukleotid gleichwertig zur nicht spezifischen Konkurrenz mit dem synthetischen Oligonukleotid Poly-dAdT (Abb. 10) oder DNA aus Lachs-Sperma (nicht dargestellt).



**Abbildung 10:** EMSA mit DRN und wGCC. Es wurden ansteigende Konzentrationen an spezifischen (wGCC) (2-6) und unspezifischen Kompetitor (PolydAdT) (7-11) von 50ng (2,7), 100ng (3,8), 200ng (4,9), 500ng (5,10) und 1µg (6,11) verwendet; als Kontrolle wGCC ohne Protein (1).

Zusätzlich bildete das, als Negative Kontrolle eingesetzte Protein bHLH46 und auch der reine *E.coli* Extrakt, der ohne DNA-Matrize inkubiert wurde einen unspezifischen Komplex auf der gleichen Laufhöhe (Abb. 11; 2-4). Eine weitere Kontrolle ist die Verwendung eines Antikörpers gegen das HA-Epitop, welches c-terminal an den ORF angehängt wurde. Durch die Bildung einer ternären Komplexes, bestehend aus Oligonukleotid, Protein und Antikörper lässt sich ein *supershift* erzeugen (Buratowski

and Chodosh, 2001). Da der ternäre Komplex durch die zusätzliche Bindung des Antikörpers größer, als der reine Oligonukleotid-Protein-Komplex ist, wird das markierte Oligonukleotid im Gel weiter verzögert. Weder mit DRN noch mit DRN-AP2 konnte ein solcher *supershift* erzeugt werden (Abb. 11, 5-6), was darauf hindeutet, dass der sichtbare Komplex durch Interaktion eines in dem *E.coli* Extrakt enthaltenen Proteins gebildet wird. Da manche Protein-DNA-Interaktionen äußerst empfindlich sind, in Bezug auf pH, Ionenstärke, Temperatur usw. (Buratowski and Chodosh, 2001), wurden *EMSA*s unter diversen Bedingungen durchgeführt. Es wurden TBE, TAE und Tris-Glycin Laufpuffer bei verschiedenen pHs verwendet und Tris und HEPES mit diversen pHs als Bindepuffersystem. Dabei wurden jeweils unterschiedliche Ionenstärken verwendet und außerdem unterschiedliche Inkubations- und Lauftemperaturen ausprobiert. Des Weiteren wurden unterschiedlich stark konzentrierte bzw. vernetzte Acrylamid-Gele verwendet. In dem Bindepuffer wurden verschiedene Konzentrationen von BSA und Glycerin getestet, was die Bindung von Proteinen an das Oligonukleotid beeinflussen kann. Unter keiner dieser Bedingungen konnte eine Bande mit DRN oder D-AP2 detektiert werden, die nicht auch in den Kontrollen auftrat (nicht dargestellt).

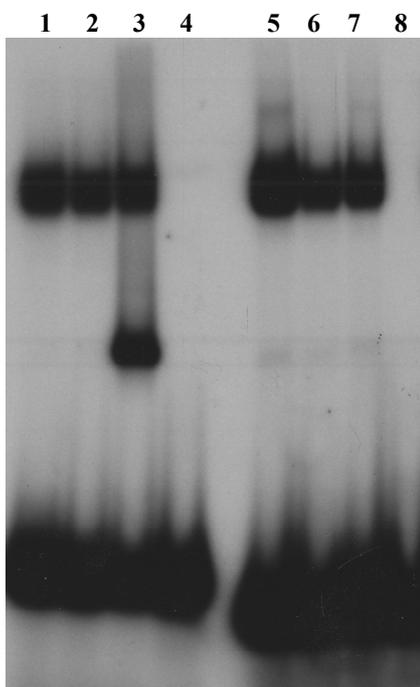


**Abbildung 11:** *EMSA* mit DRN (2) und bHLH (3) und *E. coli*-Extrakt (4) als Kontrolle mit wGCC. *EMSA* mit DRN (5) und D-AP2 (6) mit wGCC und anti-HA (Roche, Klon 3F10). Als Kontrolle wGCC ohne Protein (1).

Das zunächst verwendete Transkriptions-Translations-System basiert auf einer zweistufigen PCR, wobei zunächst Adapter an die zu translatierende Sequenz angehängt werden, und im nächsten Schritt ein HA-, Strep- oder HIS-Epitop. Die Qualität der Translation bei der Verwendung eines PCR-Produkts als Matrize lässt sich nur bedingt kontrollieren. Zwar können einzelne PCR-Produkte sequenziert werden, die Mehrheit der Population entzieht sich allerdings der Kontrolle. Deshalb lässt sich in diesem Sy-

stem sehr schlecht nachvollziehen, ob das Protein korrekt transkribiert und translatiert wurde.

Um eine bessere Kontrolle bezüglich der Matrize zu erlangen, wurde in weiteren Verlauf ein anderes Transkriptions-Translations-System verwendet. Dabei wird als Matrize für die RNA-Synthese Plasmid-DNA eingesetzt, wodurch eine gleich bleibende Qualität der Matrize für die RNA Synthese gewährleistet wird. Außerdem wurde eine Positiv-Kontrolle eingeführt, um zu überprüfen, ob der Versuchsanordnung an sich funktioniert, oder ob grobe methodische Fehler vorliegen, die mit der DNA-Bindung interferieren. Dazu wurde *AtDREB1A* kloniert, was in *bandshifts* sehr starke Affinität zum DRE-Motiv zeigte (Liu et al., 1998). Bei der Klonierung in die Expressionsvektor pIVEX2.5d und pIVEX2.6d wurden alle exprimierten Proteine n- oder c-terminal mit einem HA-Epitop versehen. Für die weiteren Experimente wurde neben *DRN* auch *DRNL* kloniert.

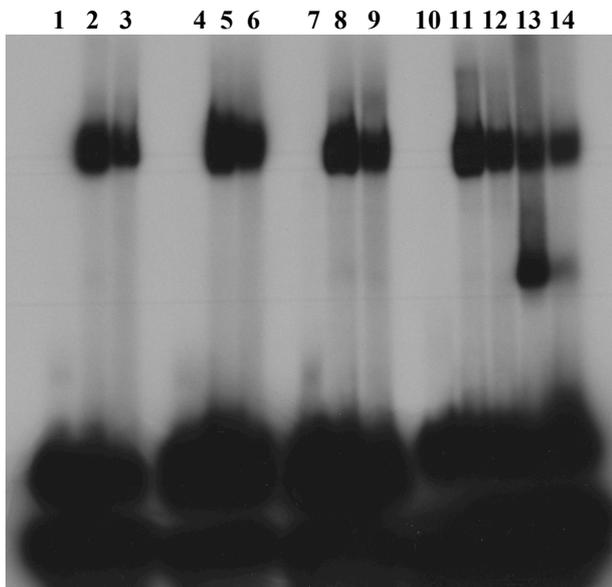


**Abbildung 12:** EMSA mit DRN (1,5) und DRNL (2,6) und DREB1A (3,7) mit wDREB (1-4) und wGCC (5-8). Als Kontrolle wDRE (4) und wGCC (8) ohne Protein.

Bei den EMSAs wurde sich zunächst an die Bedingungen, die für die Positivkontrolle verwendet wurden (Urao et al., 1993) gehalten, im weiteren Versuchsverlauf wurden ebenfalls verschiedene Parameter verändert. Es stellte sich heraus, dass DREB1A eine sehr starke Affinität gegenüber dem DRE-Motiv besitzt, und unter einer großen Bandbreite von Versuchsbedingungen stabile Komplexe mit dem Oligonukleotid bildet, hingegen nicht mit dem wGCC-Motiv. Für DRN und DRNL konnte allerdings weder mit dem wGCC-, noch mit dem DRE-Motiv spezifische Bindung detektiert werden (Abb.12). Unter allen verwendeten Parametern konnten stets deutliche Komplexe von DREB1A mit dem DRE-Motiv detektiert werden, allerdings unter keiner der getesteten

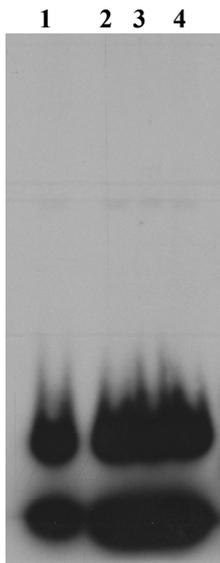
Versuchsbedingungen zwischen DRN oder DRNL mit einem der verwendeten Oligonukleotide (nicht dargestellt).

Im weiteren Versuchsverlauf wurde erneut das Expressionssystem gewechselt um rekombinante Proteine zu erzeugen, die den natives Proteinen in ihrer Struktur möglichst ähnlich sind. Die Verwendung eines auf Weizenkeimextrakt basierendes Transkriptions-Translations-System gewährleistet einerseits pflanzenspezifische posttranslationale Modifikationen, außerdem lässt sich die *in vitro* Translation möglicherweise durch einen pflanzenspezifischen Codon-Gebrauch positiv beeinflusst. In diesem Versuchsteil wurden neben den kompletten Proteinen auch die isolierten AP2-Domänen von DRN und DRNL (DL-AP2) *in vitro* translatiert. Unter keiner der getesteten Bedingungen konnte mit DRN, D-AP2, DRNL oder DL-AP2 spezifische Interaktion gezeigt werden. Die DREB1A Kontrolle bildete auch im diesem System stabile Komplexe mit dem spezifischen Motiv wDREB, nicht aber mit wGCC (Abb. 13).



**Abbildung 13:** EMSA mit DRN (2), D-AP2 (3), DRNL (5), DL-AP2 (6), DREB1A (8), Weizenkeimextrakt (9) mit wGCC und DRN (11), DRNL (12), DREB1A (13), Weizenkeim-Extrakt (14) mit wDRE. Als Kontrolle wGCC (1,4,7) und wDRE (10) ohne Protein.

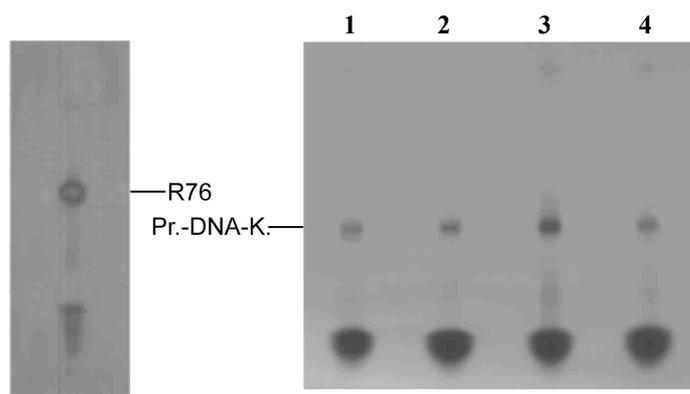
DRN und DRNL wurde des Weiteren in *E.coli* exprimiert, um ein Experiment, bei dem direkte Bindung zwischen DRN und der GCC-Box nachgewiesen wurde (Banno H., 2006) unter ähnlichen Bedingungen nach zu stellen. Statt MBP-ESR1N wurde DRN-HIS verwendet, das nach dem *QIAexpressionist* Protokoll synthetisiert und aufgereinigt wurde. Zwar konnte DRN über Ni-NTA als lösliches Protein isoliert werden, DNA-Bindung konnte aber auch hier nicht detektiert werden (Abb. 14).



**Abbildung 14:** EMSA mit 0 ng (1), 5 ng (2), 10 ng (3) und 20 ng (4) isoliertem DRN und wGCC.

### 3.2.2 Interaktion von DRN und DRNL mit alternative Motiven

Für einzelne Mitglieder der AP2/ERF-Familie, wie z. B. ANT (Nole-Wilson and Krizek, 2000) wurde bereits die Bindung an eine alternativen Zielsequenz nachgewiesen. In einer weiteren Versuchsreihe sollte die Interaktion von DRN und DRNL mit alternativen Zielsequenzen, möglicherweise Varianten des DRE- oder GCC-Motiv untersucht werden. Dafür wurde ein *Cyclic Amplification and Selection of Targets (CASTing)* durchgeführt, wobei doppelsträngige Oligonukleotide mit einer variablen Kernsequenz als Bindestelle angeboten werden, und spezifisch gebundene Oligonukleotide über mehrere Zyklen Immunoprecipitation (IP) oder *bandshift* angereichert werden können (Pollock, 2001). Für dieses Experiment wurden die Vollängenprotein DRN und DRNL (TnT-System, Promega) verwendet, DREB1A als Positivkontrolle und der Weizenkeimextrakt als Negativkontrolle. Das *CASTing* wurde insgesamt zweimal durchgeführt, beim ersten mal mit sechs IPs und abschließendem *bandshift*, in einem zweiten Experiment mit acht IPs ohne *bandshift* (Abb. 15).



**Abbildung 15:** Kontrolle des radioaktiv markierten Oligonukleotids R76 mit variabler Kernsequenz. *CASTing* mit R76 und DRN (1), DRNL (2), DREB1A (Positiv-Kontrolle) (3) und Weizenkeimextrakt (Negativ-Kontrolle) (4), Isolation des PCR-Produkts nach der 1.IP.

Im Anschluss wurden die angereicherten Oligonukleotide kloniert und sequenziert. In der Positivkontrolle DREB1A wurde das DRE-Motiv signifikant angereichert (>70% TACCGACAT). Bei der Verwendung von DRN und DRNL ergab sich keine signifikante Sequenzspezifität. Die Auswertung der Negativkontrolle ergab, dass auch in dem Ansatz ohne Protein mit HA-Epitop Oligonukleotide nach den IPs amplifiziert wurden. Die Säulen interagieren unter den verwendeten Bedingungen anscheinend auch unspezifisch DNA.

### 3.2.3 DNA-Bindestudien von DRN/DRNL-DREB1A-Chimären

Nachdem es trotz zahlreicher Experimente keinen Hinweis auf direkte Interaktion von DRN oder DRNL mit einer spezifischen DNA-Sequenz gab, wurde verstärkt Augenmerk auf die Proteinsequenzen von DRN, DRNL und DREB1A innerhalb der AP2-Domäne gelegt. Die AP2-Domäne setzt sich aus zwei strukturell unterschiedlichen Einheiten zusammen. N-terminal besteht die AP2-Domäne aus drei  $\beta$ -Faltblattbereichen, die direkt mit der DNA interagieren, die c-terminale  $\alpha$ -Helix bildet das Rückgrat und hat somit Auswirkung auf die Konfirmation.

Bei Betrachtung des *Alignments* der gesamten AP2-Domäne aller Mitglieder der AP2/ERF-Familie (Sakuma et al., 2002) fällt auf, dass DRN und DRNL an Position 43 der AP2-Domäne eine nukleophile AS besitzen (Abb. 16). DRN besitzt einen Ser-, DRNL einen Cys-Rest, zwei innerhalb der gesamten Familie äußert selten zu beobachtende AS an dieser Position. Nukleophile AS verfügen über ein freies Elektronenpaar und können damit chemische Bindungen eingehen, was die Konfirmation des Rückgrats und damit einhergehend der DNA-bindenden Domäne verursachen könnte. Um einen negativen Einfluss dieser AS auf die spezifische Bindung von DRN und DRNL an eine Zielsequenz zu beurteilen, wurden chimäre Proteine synthetisiert, indem der helikale Bereich von DRN und DRNL mit dem des DREB1A ausgetauscht wurden. Bindestudi-

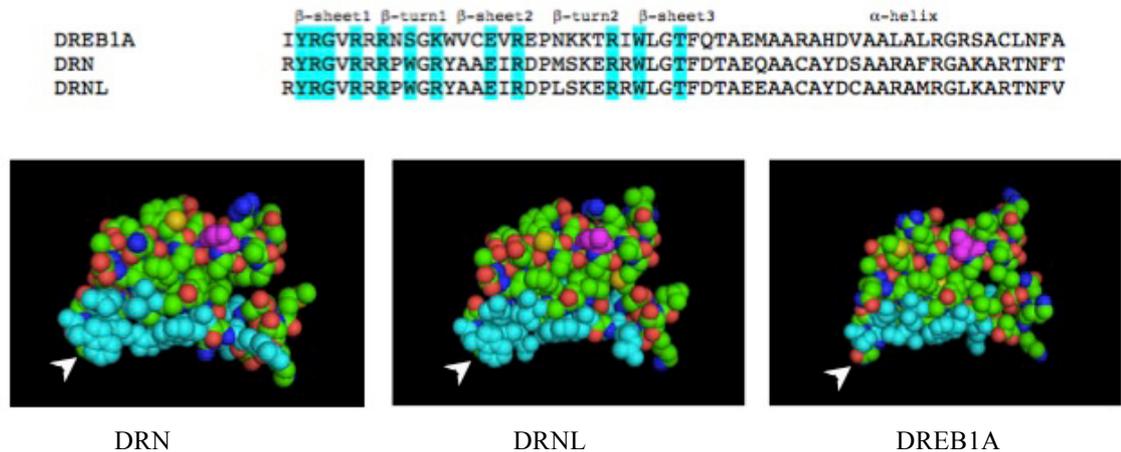
en mit diesen Chimären ergaben, dass keines der Proteine unter den untersuchten Bedingungen spezifische DNA-Interaktion zeigte (nicht dargestellt).

	$\beta$ -sheet1	$\beta$ -turn1	$\beta$ -sheet2	$\beta$ -turn2	$\beta$ -sheet3	$\alpha$ -helix																																																					
DREB1A	I	Y	R	G	V	R	R	R	N	S	G	K	W	V	C	E	V	R	E	P	N	K	K	T	R	I	W	L	G	T	F	Q	T	A	E	M	A	A	R	A	H	D	V	A	A	L	A	L	R	G	R	S	A	C	L	N	F	A	
DRN	R	Y	R	G	V	R	R	R	P	W	G	R	Y	A	A	E	I	R	D	P	M	S	K	E	R	R	W	L	G	T	F	D	T	A	E	Q	A	A	C	A	Y	D	S	A	A	R	A	F	R	G	A	K	A	R	T	N	F	T	
DRNL	R	Y	R	G	V	R	R	R	P	W	G	R	Y	A	A	E	I	R	D	P	L	S	K	E	R	R	W	L	G	T	F	D	T	A	E	E	E	A	A	C	A	Y	D	S	A	A	R	A	M	R	G	L	K	A	R	T	N	F	V

**Abbildung 16:** Vergleich der Proteinsequenz der AP2-Domäne von DREB1A, DRN und DRNL mit Schwerpunkt auf der  $\alpha$ -Helix. Die innerhalb der gesamten AP2/ERF-Familie seltene, nukleophile AS an Position 43 der DRNL- und DRN-AP2-Domäne wurde rot markiert.

Um zu testen, ob die umgebenden Domänen von DRN und DRNL einen negativen Einfluss auf die DNA-Bindeeigenschaften ausüben, wurden bereits die isolierten AP2-Domänen von DRN (D-AP2) und DRNL (DL-AP2) bezüglich ihrer Interaktion mit verschiedenen DNA-Sequenzen untersucht. Die Sequenzanalyse ergab, dass alle AS, die direkte Bindungen mit der Zielsequenz eingehen bei DRN und DRNL vorhanden sind. Trotzdem konnte in keinem der durchgeführten Experimente Protein-DNA-Interaktion detektiert werden. Möglicherweise spielt nicht nur die AP2-Domäne eine Rolle bei der Interaktion mit DNA, sondern auch umliegende Bereiche, die DNA-Bindung entweder fördern oder verhindern. Um die Rolle der umliegenden Sequenz auf die Bindeeigenschaft der AP2-Domäne zu untersuchen, wurden chimäre Proteine erzeugt, bei denen die AP2-Domäne von DRN und DRNL mit der des DREB1A ausgetauscht wurden. Durch diesen Austausch war keine der vier Chimären mehr in der Lage unter den getesteten Bedingungen DNA zu binden (nicht dargestellt).

Um eventuelle AS innerhalb der AP2-Domäne zu finden, die für die DNA-Bindung möglicherweise sterisch oder auf Grund ihrer Ladung hinderlich sein könnten, wurden Proteinmodelle erstellt. Das Programm *MacPymol* (*Schrödinger*, Mannheim) berechnet, anhand der Proteinsequenz und eines homologen Proteins mit bekannter Struktur, ein dreidimensionales Model. Die einzige auffällige AS beim Vergleich von DRN und DRNL mit DREB1A war an Position 10, an der DREB1A einen Ser-Rest besitzt, DRN und DRNL einen sperrigen Trp-Rest (Abb. 17), der möglicherweise DNA-Bindung erschwert. Der Vergleich mit anderen Mitgliedern der AP2/ERF-Familie ergab jedoch, dass die AS an dieser Position weit verbreitet ist, auch bei Proteinen, die nachweislich DNA binden (z.B. ERF1).



**Abbildung 17:** Vergleich der Proteinsequenz der AP2-Domäne von DREB1A, DRN und DRNL und Proteinmodelle von DRN, DRNL und DREB1A. In die DNA-Bindung involvierte AS sind in dem Sequenzvergleich von DREB1A, DRN und DRNL und derer Modelle hellblau dargestellt.

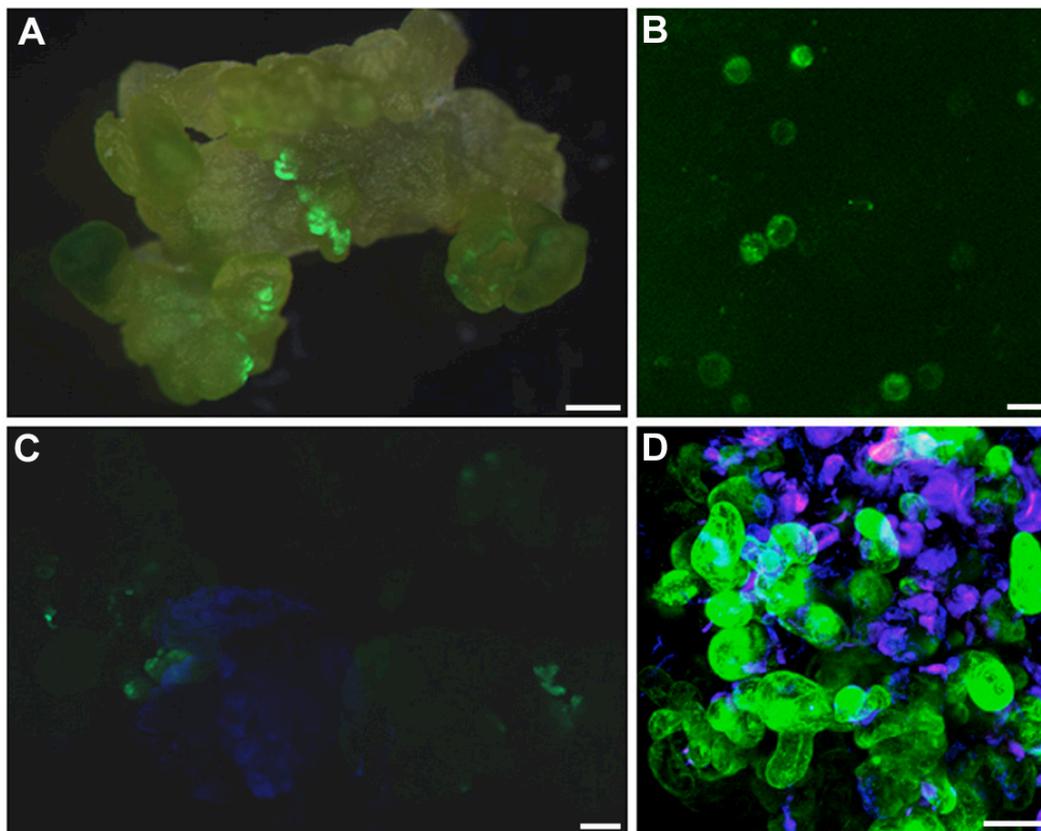
Letztlich konnte in keiner der Versuchsreihen unter den getesteten Bedingungen spezifische DNA-Bindung von DRN und DRNL nachgewiesen werden. Der Austausch einzelner Domänen (AP2 oder AP2-Helix) führte zum Verlust der DNA-Interaktion für DREB1A (DREB1A-DRN/DRNL-AP2, DREB1A-DRN/DRNL-Helix), was zu der Vermutung führt, dass die AP2 Domäne von DRN und DRNL keine DNA-bindende Eigenschaft besitzt. Andererseits konnte mit der DREB1A-AP2-Domäne, eingebettet in DRN und DRNL (DRN/DRNL-DREB1A-AP2, DRN/DRNL-DREB1A-Helix), ebenfalls keine spezifische Protein-DNA-Interaktion beobachtet werden, was zusätzlich auf einen negativen Einfluss der, die AP2-Domäne umgebenden Proteinsequenz von DRN und DRNL deuten lässt.

### 3.3 Die Identifizierung DRNL regulierter Gene via *microarray*

Ein weiterer Teil dieser Arbeit bestand darin, Gene zu finden, deren Expression von *DRNL* positiv oder negativ beeinflusst werden. Mit Hilfe von *microarrays* ließen sich Gene identifizieren, die direkt oder indirekt durch *DRNL* reguliert werden, wobei die Transkription von gut 2200 annotierten Genloci analysiert werden kann. Dafür wurden aus transgenen *pDRNL::erGFP* Linien embryonale Kalluskulturen etabliert (Mordhorst et al., 1998) (Abb. 18A), und durch *Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)* GFP-positive (Abb. 18B) und –negative Zellen getrennt, aus denen RNA isoliert werden konnte. Außerdem wurden die beiden Reporter-gen-Linien in die *primordia timing /altered meristem program1 (pt/amp1)* Mutante gekreuzt. Im Wildtyp entstehen die Kotyledonen und das SAM aus dem apikalen Teil des globulären Embryos. In der *pt* Mutante entsteht, durch eine abnormale Zellteilung im basalen Bereich, eine zusätzliche Schicht von Zellen, aus der neben dem Hypokotyl auch die Kotyledonen gebildet wer-

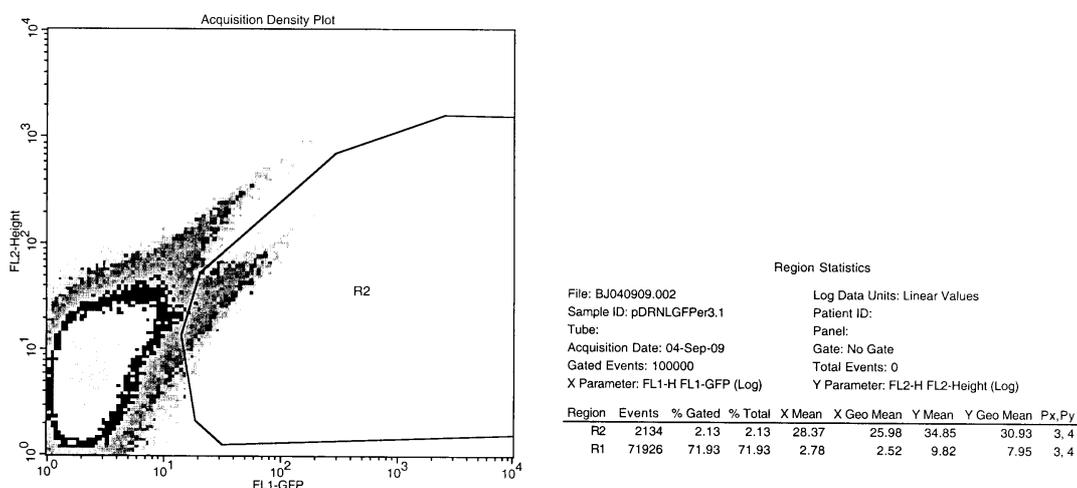
den. Die Anzahl der Kotyledonen kann erhöht sein, verglichen zum Wildtyp. Der apikale Bereich bildet in der Mutante ein stark vergrößertes Meristem (Vidaurre et al., 2007). Die Mutante ist äußerst effizient, was die Bildung von embryonaler Kalluskultur aus Keimlingen betrifft, und wurde deshalb zusätzlich zu den Reporterger-Linien im wildtypischen Hintergrund verwendet. Somatische Embryogenese im wildtypischen Hintergrund erfolgt hingegen aus unreifen zygotischen Embryonen.

Um bereits in den Kalluskulturen zu hinterfragen, ob *DRN* und *DRNL* in den selben oder in verschiedenen Zellen transkribiert werden, wurde außerdem noch Kulturen aus doppelt-transgenen Linien analysiert, die *pDRN::DRN-GFP* und *pDRNL::DRNL-CFP* exprimierten. Dabei stellte sich heraus, dass die beiden Promotoren hauptsächlich in verschiedenen Zellen aktiv sind (Abb. 18C, D).



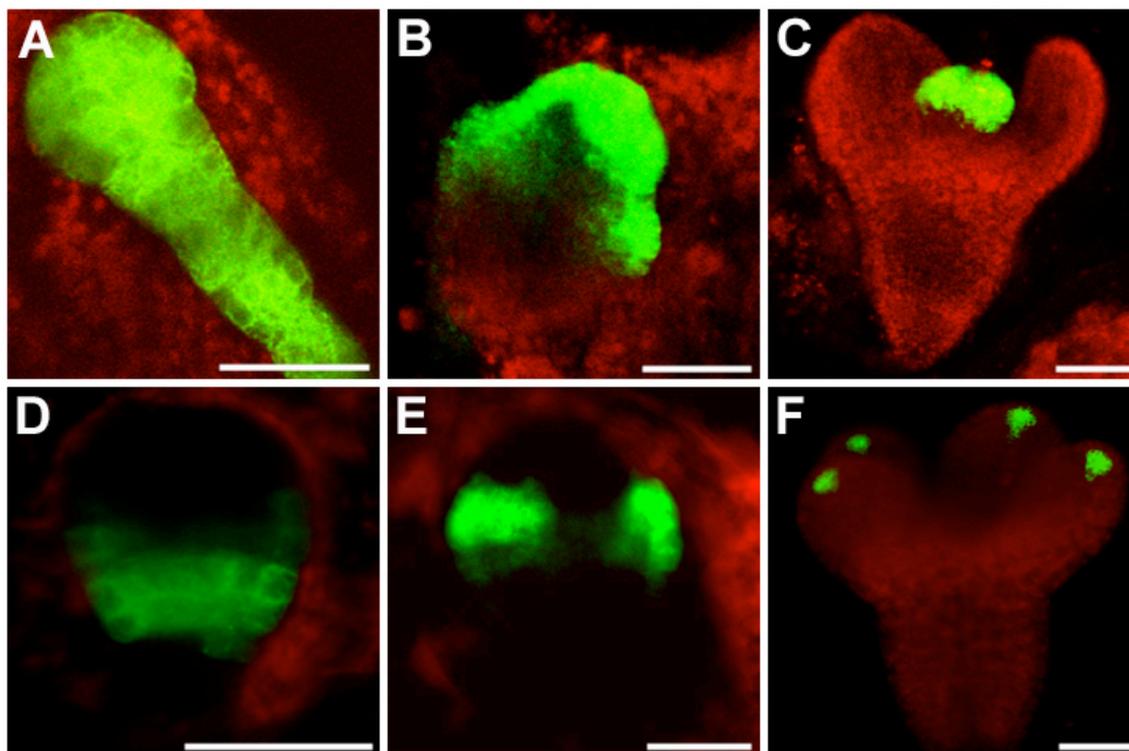
**Abbildung 18:** Transgene, embryonale Kalluskulturen *pDRNL::erGFP* (A) und *pDRN::DRN-GFP* *pDRNL::DRNL-CFP* (C,D) und Kontrolle der GFP-positiven Zellen nach der Sortierung. Messbalken entsprechen 500µm (A,C) und 20µm (B,D).

Beim *FACS* setzte sich bei den beiden verwendeten Linien *pDRNL::erGFP2-1* und *pDRNL::erGFP3-1* deutlich eine GFP-positive Subpopulation von Protoplasten ab. Der Anteil GFP-positiver Zellen lag bei 0,7% (*pDRNL::erGFP2-1*) und 2,1% (*pDRNL::erGFP3-1*) (Abb. 19). Es wurden jeweils 60.000 GFP-positive und -negative Protoplasten gesammelt. Im Vergleich dazu stellte sich das Sortieren im *pt* mutanten Hintergrund als schwierig dar. Bei insgesamt 10 Sortierversuchen wurde ein maximaler Anteil von 0,01 an GFP-positiven Zellen beobachtet (nicht dargestellt). Leider konnte im *pt* mutanten Hintergrund keine zur RNA-Präparation ausreichende Anzahl von GFP-positiven Zellen gesammelt werden.



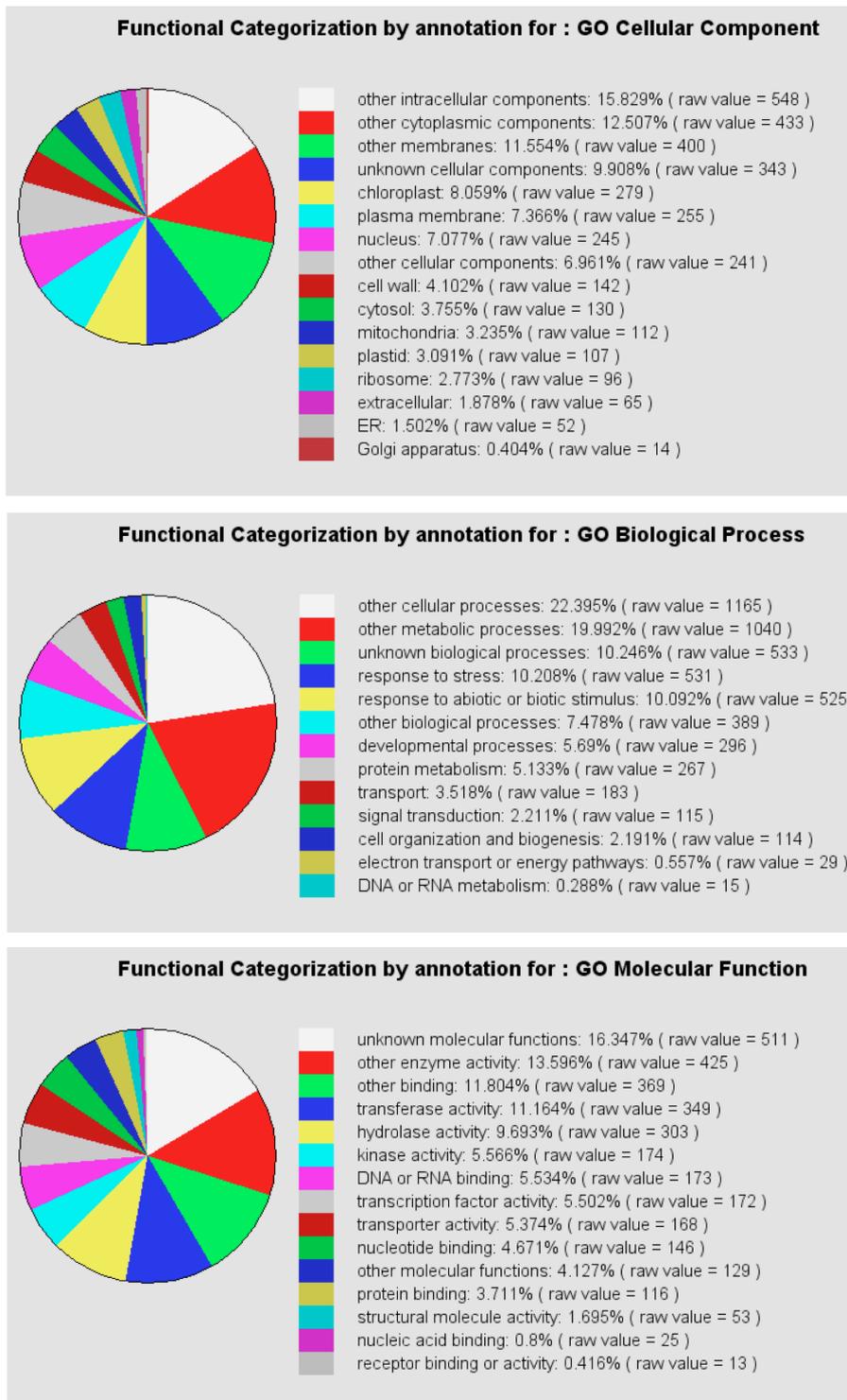
**Abbildung 19:** *Fluorescence activated cell sorting (FACS)* von *pDRNL::erGFP3-1*. Die GFP-positiven Protoplasten sind in R2 gerahmt und wurden separat aufgefangen.

Die DRN-Expression zeigte sich in den embryonalen Kalluskulturen mit mutanten Hintergrund deutlich erhöht, was vermutlich auf einem vermehrt meristematischen Charakter der Kultur auf Grund der Mutation, vergleichbar zum Embryo beruht. Ein Vergleich der Expressionsmuster in Embryonen zeigte eine deutliche Missexpression beider Proteine in frühen embryonalen Stadien. DRN wird zunächst im gesamten Embryo inklusive dem Suspensor (Abb. 20A) und später im vergrößerten Meristem exprimiert (Abb. 20B). DRNL ist im Globulärstadium basal lokalisiert (Abb. 20D), die Expressionsmaxima, die die Kotyledonen vormarkieren entstehen nicht apikal, sondern medio-lateral (Abb. 20E). Ab dem Torpedostadium sind die Expressionsmuster von *DRN* und *DRNL* dann wildtypisch. DRN ist im gesamten vergrößerten Meristem lokalisiert (Abb. 20C), DRNL in den Kotyledonenspitzen (Abb. 20F).

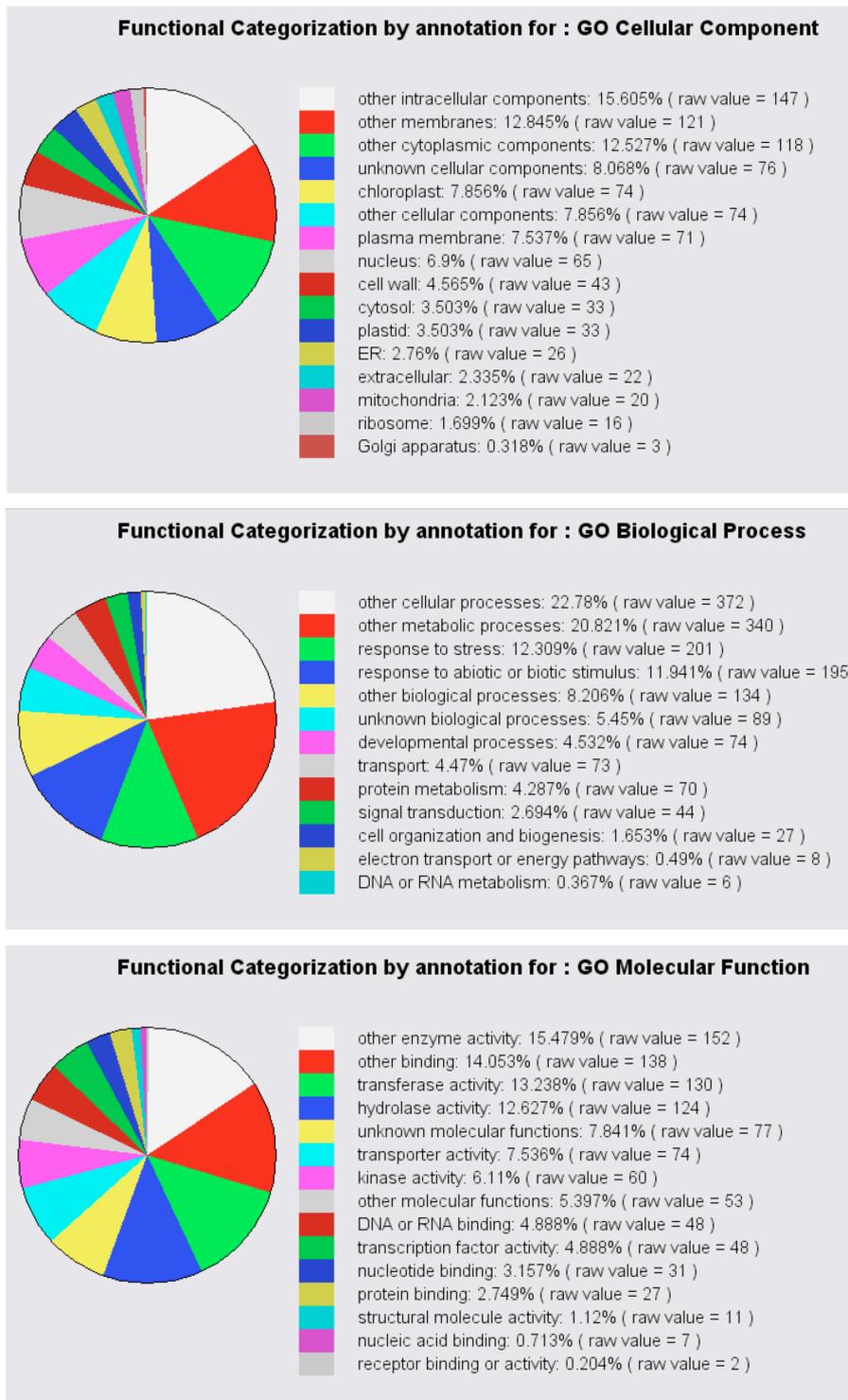


**Abbildung 19:** Expression von *pDRN::erGFP* (A-C) und *pDRNL::erGFP* (D-F) in der *pt* Mutante in Globulär- (A,E), Herz- (B,E) und Torpedostadium (C,F). Messbalken entsprechen 20 $\mu$ m.

Insgesamt sind etwa 500 Gene in DRNL-positiven Zellen differentiell transkribiert, wovon die Transkription bei ungefähr 420 negativ und 70 positiv reguliert wird. Als problematisch für die weitere Analyse ergab sich, dass ein Großteil dieser Gene entweder völlig unbekannt und nur als mögliche Protein-kodierende Sequenz deklariert waren, oder die Funktion der Gene nicht bekannt ist. Aus dem Abgleich mit anderen *microarray* Datenbanken, dem sogenannten *clustering* ergaben sich keine verwertbare Information, weshalb keine interessanten Kandidaten als mögliche Zielgene oder Prozesse, in die *DRNL* möglicherweise involviert sein könnte, identifiziert werden konnten. Somit erfolgte zunächst eine Einteilung der differentiell exprimierten Gene in funktionale Gruppen nach Zellkomponenten, biologischer Prozesse und molekularer und biologischer Funktion (*TAIR*, Abb. 21). Einzig auffällig bei der Auswertung war der leicht erhöhte Anteil von Genen, die in die Antwort auf Stress involviert sind (12% zu 10%) oder durch biotischen/abiotischen Stimulus reguliert werden (12% zu 10%) in DRNL differentiell transkribierten Genen verglichen mit allen getesteten Loci.



**Abbildung 21A:** Einteilung aller in DRNL-positiven Zellen differenziell transkribierten Genloci nach Zellkomponente, biologischem Prozess und molekularer und biologischer Funktion (*The Arabidopsis Information Resource, TAIR*).



**Abbildung 21B:** Einteilung aller in DRNL positiven Zellen differenziell transkribierten Gene mit bekannter Funktion nach Zellkomponente, biologischem Prozess und molekularer und biologischer Funktion (*The Arabidopsis Information Resource, TAIR*).

Zunächst wurden in den DRNL-Datensets nach Zielgenen gesucht, die bereits charakterisiert wurden. Durch das Aussortieren von Genen, die selber putativ sind, ein putatives Protein oder ein Protein mit unbekannter molekularer Funktion kodieren, reduzierte sich die Anzahl der differentiell exprimierten Gene für DRNL auf etwa 170. Um DRNL nach Möglichkeit in bestimmte biologische Prozesse einzuordnen, wurde schließlich genaues Augenmerk auf die Gene gelegt, die bereits in der Literatur beschrieben wurden (Tab. 4), wodurch sich die Anzahl auf 26 reduzierte.

Lokus	Gen	DRNL:GFP (fV)
AT1G21970	LEC1 (LEAFY COTYLEDON 1)	2,17
AT1G01470	LEA14 (LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT 14)	1,29
AT1G03800	ERF10 (ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR 10)	1,28
AT5G55250	ITAM1	1,06
AT3G11260	WOX5 (WUSCHEL RELATED HOMEBOX5)	1,05
AT3G50870	MNP (MONOPOLE)	0,82
AT1G07640	OBP2	0,79
AT1G78080	RAP2.4	-0,69
AT1G19220	ARF19	-0,71
AT1G77850	ARF17	-0,72
AT5G61600	ERF104	-0,73
AT4G17490	ERF6 (	-0,75
AT5G62920	ARR6 (RESPONSE REGULATOR 6)	-0,76
AT4G17500	ERF1	-0,77
AT5G47220	ERF2	-0,78
AT5G57090	EIR1 (ETHYLENE INSENSITIVE ROOT 1)	-0,85
AT1G28130	GH3.9	-0,85
AT2G25490	EBF1 (EIN3-BINDING F BOX PROTEIN 1)	-0,88
AT2G47270	UPB1 (UPBEAT1)	-0,89
AT5G47230	ERF5	-0,89
AT3G02885	GASA5 (GIBBERALIN REGULATED PROTEIN5)	-0,99
AT4G30610	BRS1 (BRI1 SUPPRESSOR 1)	-1,00
AT2G36490	ROS1	-1,04
AT1G74500	TMO7 (TARGET OF MONOPTEROS)	-1,04
AT2G28350	ARF10 (AUXIN RESPONSIVE FACTOR)	-1,15
AT1G67710	ARR11	-1,16
AT3G16770	EBP/RAP2.3 (RELATED TO AP2)	-1,22
AT1G04250	AXR3 (AUXIN RESISTANT 3)	-1,32
AT2G04160	AIR3	-2,12
AT5G42630	KAN4 (KANADI4)	-2,24
AT3G19820	DWF1 (DIMINUTO 1)	-2,47

**Tabelle 4:** Differenzille Transkription von Genen mit bekannter Funktion in *pDRNL::erGFP*. Abkürzungen: fache Veränderung (fV).

Es fiel auf, dass mehrere *ERFs* differentiell transkribiert werden, *ERF10* wird positiv reguliert, *ERF104*, *ERF6*, *ERF1*, *ERF2* und *ERF5* negativ. *ERFs* sind allgemein in die Antwort auf biotischen Stress involviert (Ohme-Takagi and Shinshi, 1995; Buttner and Singh, 1997; Ohme-Takagi et al., 2000; Zarei et al., 2011). Auch *RAP2.4* und *EBP/RAP2.3*, ebenfalls Mitglieder der AP2-Familie, werden durch abiotischen Stress reguliert (Blodner et al., 2007; Lin et al., 2008). Gene, deren Transkription durch biotischen oder abiotischen Stimulus reguliert werden, sind bereits im Abgleich aller differenziell transkribierten Gene als verstärkt vertretene Gruppe aufgetaucht (Abb. 20). Auch LEA-Proteine sind Stress-reguliert. Die Transkription von *LEA14* wird als Ant-

wort auf abiotischen Stress aktiviert, vor allem Wassermangel. LEAs fungieren unter anderem als Schutzproteine bei Austrocknung, z.B. bei der Samenreife (Singh et al., 2005).

Es tauchen mehrere, mit Auxin assoziierte Gene auf, wie der Homeobox-Faktor *WOX5*, der in die Kontrolle der Stammzellpopulation im Wurzelmeristem involviert ist (Gonzali et al., 2005; Sarkar et al., 2007). Der in DRNL-positiven Zellen negativ regulierte GATA-Faktor MNP/HAN spielt eine entscheidende Rolle für die Festlegung von Grenzen während der Embryogenese (Nawy et al., 2010). In der Mutante sind verschiedene mit Auxin assoziierte Proteine, wie *WOX5*, *PIN1* und *PIN7* fehl lokalisiert, und es kommt zu Defekten in der basalen Domäne des Proembryos. Weiterhin werden verschiedene *ARFs* (*ARF10*, *ARF17* und *ARF19*) und *AXR3/IAA17* (Leyser et al., 1996) in der DRNL-positiven Zellpopulation negativ reguliert. ARF- und AUX/IAA-Proteine können heterodimerisieren und haben eine wichtige Funktion im Auxin-Signalweg (Abel and Theologis, 1996). Das negativ regulierte *OBP2*, ein DOF-Transkriptionsfaktor, aktiviert die Transkription von *CYP83B1*, welches wiederum die Auxin-Biosynthese reguliert (Skiryecz et al., 2006). Mitglieder der GH3-Familie werden durch Auxin transkriptionell reguliert (Abel and Theologis, 1996) und kodieren IAA-Amido-Synthetasen, die die Konjugation von AS an IAA katalysieren, was zur Inaktivierung und möglicherweise auch zum Abbau führt (Staswick et al., 2005). Die Transkription der meisten *GH3s* wird durch Auxin induziert und regulieren über eine Rückkopplungsschleife die Konzentration von IAA, die Transkription von *GH3.9* jedoch scheint negativ durch IAA reguliert zu sein (Staswick et al., 2005; Khan and Stone, 2007).

Zusätzlich sind verschiedene Gene betroffen, die in andere Hormon-Signalwege involviert sind. *GASA5* wird durch Gibberellinsäure induziert und unterdrückt, durch die Kontrolle von *FLOWERING LOCUS C (FLC)* den Übergang in die reproduktive Phase (Zhang et al., 2009). *BRS1* und *DWF1* sind beide in den Brassinosteroid (BR)-Signalweg involviert. Die Carboxylpeptidase *BRS1* reguliert *BRI1*, eine Protein-Kinase, die mögliche Weise als BR-Rezeptor fungiert (Li et al., 2001). *DWF1* ist anscheinend direkt in den Steroid-Biosynthese-Weg eingebunden, wo es die Umsetzung von 2,4-Methylencholesterol zu Campesterol katalysiert (Choe et al., 1999). *EBF1*, ein F-Box-Protein ist in den Ethylen-Signalweg eingebunden und Teil eines SCF-Komplexes, der für den Abbau Ethylen-regulierter Proteine verantwortlich ist (Binder et al., 2007).

*LEC1* wurde als Schlüsselenzym in der Fettsäure-Biosynthese identifiziert und ist damit in viele Wachstums- und Entwicklungsprozesse, unter anderem der Kotyledonenentwicklung involviert.

Fast alle näher betrachteten Gene sind in verschiedene Hormon-Signalwege involviert, allerdings muss beachtet werden, dass die Auswahl der Gene nicht repräsentativ ist, sondern auf der Verfügbarkeit von näheren Informationen bezüglich der putativen Zielgene beruht.

Nachfolgend wurden die verschiedenen Datensets, *pDRN::erGFP*, *pDRN::erGFP pt* und *pDRNL::erGFP* untereinander verglichen, um mögliche Überlappungen und Differenzen zu identifizieren. Dabei stellte sich heraus, dass nur ein sehr kleines Subset von Genen in allen drei *microarrays* überlappt. Es wurden insgesamt 90 Gene identifiziert, die in allen Datensets übereinstimmend reguliert waren, wovon nur 3 transkriptionell aktiviert wurden. Diese Gene kodieren eine ATPase, einen bisher nicht charakterisierten bHLH-Transkriptionsfaktor und die S-Adenosylmethionin-abhängige Methyltransferase ITAM1, die durch die Methylierung von IAA in die Auxin-Homöostase eingreift (Qin et al., 2005). Der bHLH-Faktor ist bisher leider nicht näher charakterisiert worden, könnte aber möglicherweise, neben einem Zielgen auch einen bislang unbekanntem Komplex-Partner für DRN und DRNL darstellen. Die direkte Interaktion mit einem bHLH-Faktor, BIM1 konnte für DRN bereits nachgewiesen werden (Chandler et al., 2009). Somit wäre auch die Komplex-Bildung von DRN und DRNL mit anderen Mitgliedern dieser Familie denkbar.

Lokus	Gen	DRN:GFP (fV)	DRNL:GFP (fV)	DRN:GFP, <i>pt</i> (fV)
AT5G55250	ITAM	1,29	1,06	0,88
AT5G57090	EIR1 (ETHYLENE INSENSITIVE ROOT 1)	-0,87	-0,85	-0,64
AT2G47270	UPB1 (UPBEAT1)	-1,01	-0,89	-0,62
AT2G36490	ROS1	-0,68	-1,04	-0,63
AT1G74500	TMO7(TARGET OF MONOPTEROS)	-0,78	-1,04	-1,21
AT5G42630	KAN4 (KANADI4)	-1,23	-2,24	-2,07
AT2G04160	AIR3	-1,37	-2,12	-0,82

**Tabelle 5:** Vergleich differenzill transkribierter Genen mit bekannter Funktion in *pDRNL::erGFP* und *pDRN::erGFP* im wildtypischen und *pt* mutanten Hintergrund. Abkürzungen: fache Veränderung (fV).

Auch von diesem Datenset wurden Gene, deren Funktion bekannt ist näher analysiert (Tab. 5). In diesem Subset sind ebenfalls einige Gene enthalten, die in dem Auxin-Signalweg eingreifen.

EIR3 reguliert den Auxin-Transport (Luschnig et al., 1998), genau wie KAN4 (Izhaki and Bowman, 2007), welches vermutlich in die Regulation von PIN1 während der Embryogenese involviert ist. Die Protease AIR1 wird vermutlich über den Auxin-Rezeptor TIR1 reguliert (Xie et al., 2000) und TMO7 ist ein bekanntes Zielgen von MONOPTEROS (Schlereth et al., 2010).

Bei UPB1 handelt es sich um einen bHLH-Transkriptionsfaktor, dessen Funktion anscheinend in der Balance-Haltung von Zellproliferation und –differenzierung, unabhängig von Hormonsignalen über die Regulation von reaktiver Sauerstoff-Spezies liegt (Tsukagoshi et al., 2010). Die DNA-Glycosylase ROS1 demethyliert aktiv DNA und reguliert die Transkription von durch Methylierungen still gelegter Gene (Agius et al., 2006).

Inwiefern die positive oder negative Regulation dieser Gene direkt mit der Aktivität von DRNL bzw. DRN zusammen hängt ist jedoch fraglich. Die RNA wurde aus Zellen von mehreren Wochen alten Kallus-Kulturen isoliert. Somit könnten die Gene auch nicht direkt als primäre oder auch sekundäre Zielgene reguliert sein, sondern allgemein im Rahmen der zellulären Entwicklung reguliert werden.

## 4 Diskussion

*DRNL* kodiert ein AP2/ERF-Protein der ERF-Subfamilie. Die meisten Mitglieder dieser Familie sind in Reaktionen auf biotischen und abiotischen Stress involviert, einige wurden allerdings schon als wichtige Faktoren für verschiedene Entwicklungsprozesse identifiziert, wie *TINY* (Sun et al., 2008) und *LEP* (van der Graaff et al., 2000; Ward et al., 2006), neben *DRN* das nächstverwandten Gen. Verschiedene Mitglieder der AP2-Subfamilie, wie *AP2* und *ANT* haben eine besondere Bedeutung für die Blütenentwicklung (Bowman et al., 1989; Jofuku et al., 1994; Elliott et al., 1996). Die genaue Analyse des Expressionsmusters von *DRNL* über den gesamten Entwicklungszyklus in *Arabidopsis* führt zu der Vermutung, dass *DRNL* ebenfalls nicht an Stressreaktionen, sondern an der Rekrutierung von Gründerzellen, der Bildung von Organanlagen und der Organogenese beteiligt ist.

### 4.1 *DRNL* markiert die Gründerzellen lateraler Organe

Die Entstehung lateraler Organe lässt sich grundlegend in drei verschiedene Phasen unterteilen. Kleine Populationen von Gründerzellen werden aus dem Meristem rekrutiert, worauf hin es zunächst zur kontrollierten Zellteilung kommt. Die daraus entstehende Organanlage, bildet ein histologisch erkennbares Primordium und unterläuft Organogenese, was letztlich zur Entstehung eines adulten Organs führt (Beveridge et al., 2007). Mit Hilfe verschiedener histologischer und klonaler Analysen konnte die Anzahl von Gründerzellen, die zur Bildung verschiedener Organe benötigt werden, bestimmt werden (Irish, 1992; Bossinger and Smyth, 1996). Dabei wurde für Blätter eine Anzahl von 1-9 Zellen festgestellt. Die verschiedenen Blütenorgane entstehen jeweils aus 2 Zellen (Petale), 4 Zellen (Stamen) oder 8 Zellen (Sepalen und Karpelle).

Es konnte gezeigt werden, dass *DRNL* inzipiente Organanlagen, sowohl während der vegetativen, als auch der reproduktiven Phase vormarkiert, und zwar zeitlich deutlich bevor diese histologisch identifizierbar sind. Die beobachtete Anzahl der von *DRNL* vorgemusterten Zellen stimmt für alle Organe mit den mittels klonaler Sektoranalyse ermittelten Zellanzahlen genau überein. Es wurde weiter beobachtet, dass sich die Expressionsdomäne, im Rahmen, der zur Entstehung einer Organanlage benötigten kontrollierten Zellteilung, zunächst erweitert und sich über alle Zellen, die morphologisch dem inzipienten Organprimordium zugehörig sind, erstreckt. Während des Auswachsens von Primordien und der Organogenese wird *DRNL* nur in wenigen Zellen der differenzierenden Organe exprimiert. Ein weiterer Hinweis auf die Rekrutierung von Grün-

derzellen durch *DRNL* ergibt sich aus den in der *prs* Verlustmutante beobachteten Mustern. In der Mutante ist das Auswachsen lateraler Sepalen inhibiert, trotzdem werden diese angelegt (Matsumoto and Okada, 2001; Nardmann et al., 2004). *DRNL* mustert deutlich die inzipienten Organanlagen vor, ohne dass diese elaborieren.

*DRNL* scheint also in alle drei Phasen der Bildung lateraler Organe involviert zu sein, von der Rekrutierung von Gründerzellen aus dem vegetativen, dem reproduktiven oder dem floralen Meristem, über die Bildung von Organanlagen bis hin zum Auswachsen der Organprimordien.

#### **4.1.1 Die Bildung lateraler Organanlagen aus dem embryonalen und vegetativen SAM erfolgt nach dem selben Muster**

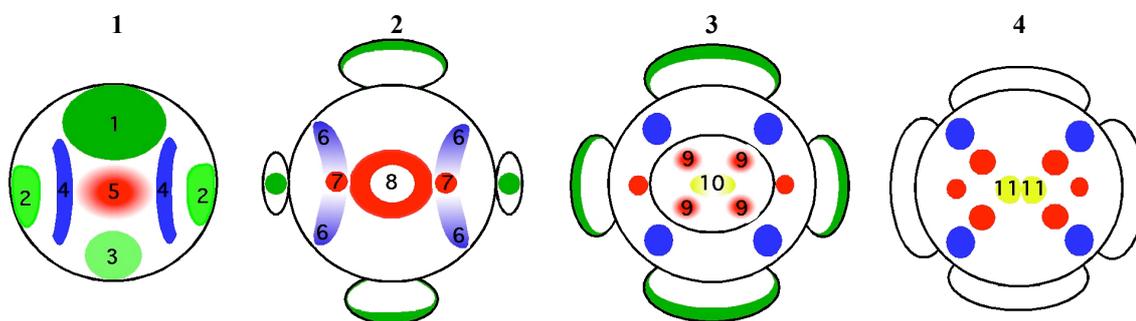
Expression von *DRNL* ist schon zu Beginn der Embryogenese detektierbar. Ab dem 16-Zell-Stadium ist der *DRNL*-Promotor im gesamten Proembryo aktiv. Während der weiteren Entwicklung verlagert sich das Expressionsmaximum in den apikalen Bereich des Embryos, wo es sich gegen Ende des Globulärstadiums in zwei distinkte laterale Signale trennt, die die Kotyledonenanlagen vormustern. Ab diesem Zeitpunkt, bis hin zur Entstehung floraler Meristeme aus dem IM wird *DRNL* nicht mehr in Zellen mit meristematischem Charakter exprimiert, sondern ausschließlich in primordialen Zellen, wie den Kotyledonenprimordien, oder während der Organogenese, wie letztlich in wenigen Zellen der Kotyledonen. Während des vegetativen Wachstums, bei der Entstehung von Blattprimordien, ist der *DRNL*-Promotor zunächst in sämtlichen Zellen, die morphologisch der neuen Blattanlage zugehörig sind, aktiv. Sobald das Primordium auswächst, beschränkt sich die Expressionsdomäne von *DRNL* zunächst auf den apikalen Bereich, später ist Expression nur noch in wenigen Zellen der L2-Schicht zu detektieren. Die Expression von *DRNL* erfolgt also in zwei verschiedenen Organtypen, während der Entwicklung der Kotyledonen und Blätter nach dem gleichen Muster zunächst weitläufig in der inzipienten Organanlage, später in wenigen Zellen der L2 und L3 Schicht der Primordien.

#### **4.1.2 Die Entstehung floraler Organe unterliegt verschiedenen Musterbildungsprozessen**

Anhand des Expressionsmusters von *DRNL* lässt sich weiterhin die Entstehung der einzelnen floralen Organanlagen verfolgen, welche im Laufe der Blütenentwicklung alle sukzessiv vormarkiert werden (Abb. 20). Dabei fällt auf, dass diese anscheinend durch grundlegend verschiedene Musterbildungsprozesse entstehen. Die Sepalen werden dekussiert, oder die medialen Sepalen eventuell einzeln und die lateralen Sepalen paarwei-

se angelegt. Die Petalen-, genau wie die Stamenanlagen stammen aus jeweils gemeinsamen morphogenen Feldern, die erst während der weiteren Entwicklung zu einzelnen Organanlagen separieren.

Mit Hilfe einer dreidimensionalen Darstellung des *pDRNL::erGFP* Expressionsmusters während der frühen Stadien der Blütenentwicklung konnte veranschaulicht werden, dass *DRNL* sämtliche Organanlagen vormustert. Bereits im P-1 und P0 Stadium wird *DRNL* in inzipienten Blütenprimordien exprimiert, wobei im P-1 Stadium etwa 4-8 Zellen vormarkiert werden. Sobald es durch kontrollierte Zellproliferation zum Auswachsen der Blütenanlage kommt ist der Promotor in dem gesamten Blütenprimordium aktiv.



**Abbildung 20:** Schematische Darstellung der *DRNL*-Expression im FM.

Organanlagen und morphogene Felder sind nummeriert in der Reihenfolge ihres Auftauchens während der Blütenentwicklung. Abaxiale Sepale (1), laterale Sepale (2), abaxiale Sepale (3), laterale, morphogene Felder (4) und zentrales, morphogenes Feld (5) in Schema 1. Auftrennung des morphogenen Feldes (4) in vier diskrete Signale, die die Petalen (6) und zwei, die die lateralen Stamen (7) vormarkieren, das ringförmige, morphogene Feld (8), welches die medialen Stamen vormustert wird etabliert, die Expression in den auswachsenden Sepalen beschränkt sich auf die Spitzen (Schema 2). Das ringförmige morphogene Feld trennt sich in vier Signale, die die medialen Stamen markieren (9), zentral werden die Karpellanlagen vorgemustert (10) (Schema 3), dabei bilden sich schnell zwei distinkte Signale (11) im Zentrum (Schema 4).

Im weiteren Verlauf der Blütenentwicklung werden zunächst die Sepalen sequenziell in der Reihenfolge abaxiale, laterale und adaxiale Sepale initiiert (Abb. 20; 1-3). Interessanter Weise würden nach dieser Interpretation die beiden medialen Sepalen jeweils einzeln, die beiden lateralen Sepale zeitlich dazwischen und parallel angelegt werden. Die Organisation dieser sequentiellen Initiierung könnte rein morphologisch begründet sein. Dabei könnten die Zellen für die Bildung der abaxialen Sepalenanlage direkt rekrutiert werden, nachdem die Entscheidung zur Entstehung einer neuen Blütenanlage getroffen wurde. Die Initiierung der lateralen Sepalenprimordien würde aber zunächst ein Auswachsen des kompletten Blütenprimordiums voraussetzen, um Platz für die neuen Organanlagen zu schaffen bzw. eine ausreichende Anzahl an Zellen innerhalb des FMs zu bilden. Für die Rekrutierung von Zellen für die adaxiale Sepale könnte die morphologische Abgrenzung durch die Bildung einer Furche zwischen IM und Blütenprimordium erforderlich sein, entweder ebenfalls um ausreichend Platz, oder um eine eventuell nötige Separierung zwischen IM und der neuen Organanlage zu schaffen. Das

abaxiale Sepalenprimordium würde nach dieser Interpretation nicht nur zuerst angelegt werden, es ist auch größer, als die der lateralen und adaxiale und elaboriert kurze Zeit bevor sich die restlichen Sepalenprimordien erheben (Hill and Lord, 1989). Die Begründung dafür könnte in dem evolutionären Verlust des floralen Tragblattes liegen, wodurch die abaxiale Sepale deren Position einnimmt und aus einem, in diesem Sektor vergrößert initiiertem Primordium entsteht (Sauders, 1923; Hagemann, 1963).

Alternativ dazu könnte das Expressionsmaximum vom P-1 bis P1 Stadium nicht die abaxiale Sepale bzw. gemeinsame Vorläuferzellen für Tragblatt und abaxiale Sepale markieren, welche während der Entwicklung unterschiedliche Zellschicksale unterlaufen, sondern das rudimentäre Tragblatt vormustern. In *Arabidopsis* entstehen FMs, genau wie primäre und sekundäre Meristeme wahrscheinlich *de novo* in den Achseln von Hoch- bzw. Tragblättern, deren Auswachsen in der Blüte unterdrückt wird (Long and Barton, 2000; Kwiatkowska, 2006; Alvarez-Buylla et al., 2010). Der Meristem-Marker *STM* wird im gesamten IM exprimiert, nicht aber in den Zellen der inzipienten Blütenprimordien, was eher gegen die Theorie sich abspaltender Meristeme spricht (Long and Barton, 2000). Ab dem Blütenstadium 2 wird *STM* dann im Zentrum des Blütenprimordiums, dem floralen Meristem exprimiert. Vor diesem Hintergrund wäre denkbar, dass die distal markierten Zellen in der Stadium 2 Blüte zunächst ausschließlich das kryptische Tragblatt vormustern, dessen Vorläuferzellen aus dem IM rekrutiert werden. Sämtliche Blütenorgane werden erst nach der Neuorganisation der FMs aus Zellen, die zur Bildung der lateralen Organe aus der Peripherie des floralen Meristems abwandern, initiiert. Nach dieser Interpretation wären die zuerst angelegten Blütenorgane die lateralen Sepalen, deren Vorläuferzellen aus dem floralen Meristem rekrutiert werden. Gegen Ende des 2. Blütenstadiums entstehen die Anlagen der medialen Sepalen relativ zeitgleich, wobei die abaxiale Sepale nicht aus den bereits ab dem P-1 Stadium markierten Zellen entsteht, sondern für beide Blütenorgane Zellen neu aus dem FM abwandern. In Abbildungen 5C und E wird das selbe Blütenprimordium aus verschiedenen Perspektiven dargestellt. In 5C sind bereits einige Zellen adaxial sehr schwach vormarkiert, und auf der abaxialen Seite sind in Abbildung 5E deutlich zwei distinkte Signale erkennbar, welche nach dieser Theorie nicht durch eine Zweiteilung der frühen abaxialen Signals in ein oberes und unteres Maximum entstehen, sondern durch die Rekrutierung meristematischer Zellen aus dem FM zur Bildung der abaxialen Sepale durch *DRNL*. Somit würden alle vier Sepalen in einem dekussierten Modus entstehen. Die Theorie, dass die medialen und die lateralen Sepalen paarweise zusammengehörig sind, und von einander unabhängig entstehen, lässt sich auch durch die floralen Defekte der *prc* Verlustmutante untermauern (Matsumoto and Okada, 2001). Die lateralen Sepalen dieser Mutante werden angelegt, elaborieren aber nicht, wobei die medialen Sepalen nur marginal betroffen sind, was für eine gekoppelte Initiierung der beiden einzelnen Paare spricht.

Einen weiteren interessanten Aspekt der frühen Blütenentwicklung umfasst die Entstehung einzelner Organanlagen aus morphogenen Feldern, wie bei der Organisation von Petalen und Stamen. Bereits in Stadium 2 werden von *DRNL* lateral des FM's zwei sichelförmige Felder (Abb. 20; 4), bestehend aus zwei Zellreihen, markiert. Kurz darauf, zu Beginn des dritten Blütenstadiums, lässt sich eine ringförmige Expressionsdomäne detektieren, die das FM umschließt (Abb. 20; 5, 8). Diese morphogenen Felder markieren die Peripherie des floralen Meristems und beinhalten Vorläuferzellen, die zunächst allgemein zur Bildung lateraler Blütenorgane rekrutiert wurden. Im Verlauf der weiteren Blütenentwicklung separieren sich innerhalb dieser Felder die einzelnen inzipienten Organanlagen.

Aus den beiden lateralen Feldern entstehen jeweils zwei Petalen (Abb. 20; 6). Zwischen den beiden Maxima, ein bis zwei Zellreihen Richtung Zentrum verschoben werden die lateralen Stamen von *DRNL* markiert (Abb. 20; 7). Dabei lässt sich nicht differenzieren, ob die verschiedenen Organe aus den Selben Vorläuferzellen entstehen, oder ob die Rekrutierung der Zellen für Petalen und laterale Stamen zwei getrennte Prozesse darstellen. Das zu Beginn etwa 6-8 Zellen umfassende morphogene Feld könnte zunächst nicht auf einen bestimmten Organtypus festgelegt sein und erst zu einem späteren Zeitpunkt in Petalen- und Stamengründerzellen unterteilt werden. Unter dieser Betrachtung wäre die Rekrutierung von Gründerzellen zur Entstehung dieses Feldes eher positions- als organabhängig. Daraus würde sich eine Art zweistufiger Entwicklungsprozess ergeben, indem zunächst die Entscheidung zur Rekrutierung von Organgründerzellen getroffen wird und erst zu einem späteren Zeitpunkt dann die Aufteilung in Petalen- und Stamengründerzellen. Außerdem wäre die Bildung zweier morphologisch und funktional völlig verschiedener Organtypen damit in gewissem Maße gekoppelt. Alternativ dazu könnten die lateralen Stamen auch zeitlich unmittelbar folgend, jedoch als unabhängiges Ereignis initiiert werden. Das Blütenprimodium ist zu diesem Zeitpunkt noch sehr komprimiert, wodurch die Vorläuferzellen einzelner Wirtel meist direkt an einander angrenzen, oder maximal eine Zellreihe dazwischen liegt. Das ringförmige Feld stößt zu Beginn lateral unmittelbar an das Petalenfeld, und die klare Abgrenzung der Gründerzellen von Petalen, lateralen Stamen und medialen Stamen ist erst erkennbar, wenn das Blütenprimordium weiter auswächst. In Anbetracht von Funktion und Morphologie ist jedoch die Entwicklung von Petalen und lateralen Stamen aus zwei unabhängigen Populationen von Gründerzellen anzunehmen.

Die Entstehung aller Stamen aus gemeinsamen Vorläuferzellen ist jedoch in Anbetracht der Expressionsmuster eher unwahrscheinlich. In Stadium 4 ist deutlich erkennbar, dass die Anlage der lateralen Stamen nicht aus dem ringförmigen morphogenen Feld entspringt, sondern die markierten Zellen außerhalb dieses Feldes, etwas basaler bzw. weiter entfernt von der apikalen Blütenspitze liegen. Außerdem sind die vier Maxima, die die medialen Stamenanlagen vormarkieren (Abb. 20; 9) noch nicht deutlich von einan-

der getrennt, während an der Position der späteren lateralen Stamenanlagen nur wenige Zellen markiert sind, die des Weiteren bereits durch eine Zellreihe von den vorgemusterten medialen Stamen abgegrenzt sind. Ein anderes Indiz für getrennte Entwicklungsprozesse bezüglich medialer und lateraler Stamen liefert auch die unterschiedliche Morphologie über verschiedene Entwicklungsstadien (Smyth et al., 1990). Die medialen Stamen elongieren zu einem etwas früheren Zeitpunkt in Stadium 5 und auch stärker, als die lateralen Stamen, weshalb die medialen auch als lange, die lateralen als kurze Stamen bezeichnet werden. In diesem Zusammenhang liefert auch die Analyse der *drnl-1* Verlustmutanten interessante Daten (Chandler, nicht veröffentlicht). Die *drnl-1* Mutante weißt mit 4,5, verglichen mit 5,9 im Wildtyp eine deutlich verringerte Anzahl von Stamen auf. Die Einzelmutante bildet durchschnittlich nur 1,5 laterale Stamen, die Anzahl der medialen Stamen dagegen ist nur selten reduziert. Auch im wildtypischen *Col*, *Ler* und *WS* Pflanzen fehlt gelegentlich eins der laterale Stamen, bezüglich der medialen Stamen werden solche Defekte allerdings nicht beobachtet. Des Weiteren sind in *drnl-1* Mutanten häufig fusionierte Stamen zu beobachten. Diese Fusionen entstehen mit hoher Präferenz zwischen medialen Stamen (86%) und nur gelegentlich zwischen medialen und lateralen Stamen (16%). Daraus ergibt sich zu einen, dass die medialen und lateralen Sepalen eher aus von einander unabhängigen Prozessen stammen. Des Weiteren scheint *DRNL* eine entscheidende Funktion für die Initiierung von Organen und die Grenzziehung dazwischen zu besitzen.

Die beiden Karpelle werden als zwei separate Organe entlang der medio-lateralen Achse initiiert und fusionieren entlang der proximal-distalen Achse zu einem Hohlzylinder. Trotz dieser schlauchförmigen Struktur, findet sich hier keine ringförmige Expressionsdomäne an der apikalen Spitze, sondern zwei sehr lokale Maxima lateral des FM's gelegen (Abb. 20; 10, 11). Damit zeigen sich im Falle der Organogenese des Gynoeceums schon sehr früh (Stadium 4-5), deutlich bevor es zum Auswachsen der Organanlage in Stadium 6 kommt, qualitative Unterschiede zwischen den Zellen, die zur Bildung dieses Organs rekrutiert wurden. Konträr zu dieser Beobachtung findet sich für alle anderen Organprimordien zu den Zeitpunkt an dem sie morphologisch erkennbar sind *DRNL* Expression in der kompletten Organanlage, und beschränkt sich erst zu einem späteren Zeitpunkt auf ausgewählte Zellen an apikaler Position.

Die Spezifizierung der Blütenorgane wird derzeit hauptsächlich durch die ABC-Gene begründet. Die räumlich-zeitliche Expression dieser Transkriptionsfaktoren führt im frühen Blütenstadium zur konzentrischen Aufteilung des jungen Blütenprimordiums in einzelne Wirtel (Bowman et al., 1991; Coen and Meyerowitz, 1991). Die Missexpression dieser Gene führt zu homöotischen Mutationen, die wirtel- und nicht organspezifisch sind. Im Gegensatz dazu scheint *DRNL* in die Bildung von Organanlagen in allen Wirteln involviert zu sein. Die Analyse von *ap3/pi drnl* Doppelmutanten ergab, dass *DRNL*

nicht mit dem ABC-Model verknüpft ist, und die Blütenentwicklung über davon unabhängige Mechanismen reguliert (Nag et al., 2007).

Die Expressionsmuster von *DRNL* während der Blütenentwicklung bekräftigen eindrucksvoll die alternative Theorie der sechs Blütenwirtel (Steinheil, 1839; Alexander, 1952). Unter der oben diskutierten Annahme, dass von dem frühen abaxialen Expressionsmaximum im P-1 bis P1 Stadium ein kryptisches Tragblatt vorgemustert wird, markiert *DRNL* zunächst dekussiert die beiden lateralen Sepalen im ersten Wirtel und kurz darauf die medialen Sepalen, die den zweiten Wirtel bilden. Die vier Petalen werden in zwei morphogenen Feldern vormarkiert und trennen sich später auf, was auf die Duplizierung der Organe (De Candolle, 1821) hinweisen könnte. Außerdem konnte anhand des Musters gezeigt werden, dass laterale und mediale Stamen aus verschiedenen Vorläuferzellen stammen, und demnach definitionsgemäß aus verschiedenen Wirteln entspringen. Die Karpelle entstehen paarweise im innersten Wirtel.

Durch die Expression über die verschiedenen Entwicklungsphasen der Organogenese und in allen Organtypen von Blüten eignet sich *DRNL* ausgezeichnet als Marker zur Beobachtung floraler Musterbildungsprozesse. Die Analyse des Marker in Mutanten mit Blütendefekten kann Aufschluss geben, welche Entwicklungsschritte betroffen sind, bzw. in welchen Stadien es zu fehlerhaften Musterbildungen kommt. Für die, in der Bildung lateraler Organe beeinträchtigte *prs* Mutante konnte bereits deutlich gezeigt werden, dass die lateralen Sepalenanlagen zwar initiiert werden, die Elongation der inzipienten Organprimordien allerdings ausbleibt. Weiterhin könnte die Suche nach *DRNL* orthologen Genen in anderen Spezies und die Beobachtung der Expressionsmuster während der floralen Musterbildung Aufschluss geben, bezüglich Gemeinsamkeiten und Abweichungen in der Anlage divergenter Baupläne verschiedener Blüten.

## **4.2 Die partielle Redundanz von *DRN* und *DRNL* ist hauptsächlich begründet in funktionaler Equivalenz und überlappenden Expressionsdomänen**

Die Verwandtschaft von *DRN* und *DRNL* erklärt sich durch Entstehung beider Gene aus einer intrachromosomalen Duplikation auf Chromosom 1. Nach einer Duplikation kann es zur Akkumulation von Mutationen in einem der duplizierten Gene kommen. Unter positivem Selektionsdruck können die Proteine dann unterschiedliche Funktionen übernehmen, während die ursprüngliche Funktion nicht völlig verloren geht, wodurch eine partielle Redundanz entsteht (Nowak et al., 1997). Die Unterschiede von *DRN* und *DRNL* sind anscheinend größtenteils regulatorischer Natur. Die Proteine können gegenseitige Funktionen übernehmen, wenn sie vom Promotor des anderen Gens reguliert

werden. Somit verhalten sie sich auf Proteinebene weitestgehend equivalent. Vielleicht lässt sich durch diese gewisse Promiskuität der Proteine auch der dramatische Effekt einer konstitutiven Überexpression erklären, und vergleichsweise marginale Effekte in den Verlustmutanten (Kirch et al., 2003; Marsch-Martinez et al., 2006; Ward et al., 2006; Chandler et al., 2007; Nag et al., 2007). *DRN* und *DRNL* sind Mitglieder einer Proteinfamilie mit einer hoch konservierten Domäne, somit wäre es auch denkbar, dass es noch weitere Vertreter mit partiell redundanter Funktion gibt. Da die Proteine außerhalb der AP2-Domäne keine große Ähnlichkeit zeigen, innerhalb dieser jedoch hoch konserviert sind, könnte die Funktion beider Proteine mit dieser Domäne assoziiert sein. Interessant wäre, ob das nächst verwandte Gen *LEP*, oder möglicherweise ein anderer beliebiger ERF, die sich von *DRN* und *DRNL* bezüglich der Proteinsequenz ihrer AP2-Domäne ebenfalls kaum unterscheiden, getrieben vom *DRNL*-Promotor in der Lage ist, den Phänotyp der *drnl-2/bcm-1* Mutante zu retten.

*DRN* und *DRNL* werden zu Beginn der Embryogenese koexprimiert, zunächst im gesamten Proembryo, später begrenzt auf den apikalen Bereich und dann ausschließlich auf die Kotyledonenanlage. Das SAM wird schon im frühen Stadium der Embryogenese angelegt. Die beiden Positiv-Regulatoren des SAM *WUS* und *STM* sind ab dem Dermatogen- bzw. Globulärstadium in den inneren apikalen Zellen exprimiert (Mayer et al., 1998; Aida et al., 1999). Zu diesem Zeitpunkt ist die Expression von *DRN* und *DRNL* bereits auf zwei laterale Maxima überwiegend in der L1-Schicht konzentriert, außerhalb des neu entstehenden SAMs. Ab dem Torpedostadium überlappen die Expressionsmuster der beiden Gene dann kaum noch. Der *DRN*-Promotor ist über die verschiedenen Entwicklungsstadien der Pflanze hinweg fast ausschließlich in meristematischen Zellen aktiv, während *DRNL* aus dem Meristem ausgegrenzt ist, und in Zellen mit primordialem Charakter exprimiert wird. In diesem Zusammenhang sind auch die veränderten Expressionsmuster in der *pt* Mutante, in der ein vergrößertes embryonales SAM angelegt wird (Mordhorst et al., 1998), während der frühen Stadien der Embryogenese interessant. Der *DRN*-Promotor zeigt im Globulärstadium im gesamten Embryo inklusive Suspensor vermehrte Aktivität. Die *DRNL*-Expression unterscheidet sich in diesem mutanten Hintergrund schon im Globulärstadium drastisch vom *DRN* Expressionsmuster obwohl die beiden Gene zu diesem Zeitpunkt im Wildtyp koexprimiert werden. Die Expressionsdomäne ist in den basalen Teil des Proembryos, konträr zum apikalen Maximum im Wildtyp verlagert. Diese divergenten Expressionsmuster lassen sich möglicherweise dadurch begründen, dass es in der *pt* Mutante nicht nur zur Vergrößerung der meristematischen Zone kommt, sondern die Differenzierung von Zellen, hin zu meristematischer oder primordialem Identität bereits in einem Stadium getroffen wird, in dem im Wildtyp das Zellschicksal noch weitestgehend offen ist. Diese Muster lassen ebenfalls auf eine deutliche Diskrepanz bezüglich der transkriptionellen Regulation der beiden Gene schließen.

Obwohl für *DRN* und *DRNL* funktionale Unterschiede bezüglich der genetischen Interaktion mit *PIN* und *PID*, oder verschiedener *CUC*-Gene nachgewiesen werden konnten, lässt sich auch eine partielle Redundanz der beiden verschiedenen Gene beobachten (Chandler et al., 2010). Die Penetranz des embryonalen Kotyledonendefektes der *drn* Mutante ist in der *drn drnl* Doppelmutante deutlich erhöht (Chandler et al., 2010). Während der Musterbildung im apikalen Embryo scheinen die beiden zu diesem Zeitpunkt koexprimierten Gene also hoch redundant zu sein. Im Gegensatz zu *drnl-1* besitzt die *drnl-2/bcm1* Mutante, ein hypermorphes Allel von *drnl-1*, ebenfalls einen Kotyledonenphänotyp (Nag et al., 2007). Im *Promotor-swap*-Experiment konnte gezeigt werden, dass sowohl *DRN* exprimiert unter dem *DRNL*-Promotor, als auch ein *pDRN::DRNL*-Konstrukt den Phänotyp rettet (Chandler et al., 2010). Für die Rettung des Phänotyps scheint also eine gewisse Konzentration der beiden Proteine insgesamt ausreichend. Auch während der Blütenentwicklung ist eine gewisse Redundanz von *DRN* und *DRNL* zu beobachten. In der *drnl-1 cuc-1* Doppelmutante fehlen die lateralen Stamen zu 84%, in der *drn drnl cuc-1* Tripelmutante ist der Phänotyp voll penetrant. Die *CUC* Gene besitzen eine wichtige Funktion für die Grenzziehung zwischen Organanlagen, und werden in den Zellen, die die inzipienten Primordien umschließen, exprimiert. Des Weiteren kann die *drnl-2/bcm1* Mutante, die einen starken Blütendefekt zeigt, komplett gerettet werden, wenn *DRN* vom *DRNL*-Promotor getrieben wird (nicht veröffentlicht). Die Basis der partiellen Redundanz während der Kotyledonenentwicklung und der Entstehung von Blütenorganen liegt also wahrscheinlich hauptsächlich in der zeitweiligen Koexpression und funktionaler Äquivalenz der Proteine.

Obwohl *DRNL* an der Initiierung aller Blütenorgane anscheinend gleichermaßen beteiligt ist, beschränkt sich der Blütendefekt in *drnl-1* und *drnl-2/bcm-1* erstaunlicher Weise hauptsächlich auf die lateralen und medialen Stamen. In der *drnl-2/bcm-1* Mutante tauchen gelegentlich petaloide Sepalen im äußeren Wirtel auf und Sepal-Petal-Mosaik, am drastischsten sind jedoch die Stamen betroffen, deren Anzahl mit 3,1 verglichen zum Wildtyp (5,8) deutlich reduziert ist (Nag et al., 2007). Oft finden sich auch Fusionen zweier Stamen, oder es werden stattdessen filamentöse Organe gebildet, was eventuell ebenfalls durch eine äquivalenten Funktionalität der beiden Proteine erklärt werden kann. Zwar konnte in der *drn drnl-1* keine erhöhte Penetranz der Stamendefekte bzw. Defekte von anderen Blütenorganen festgestellt werden, abgesehen von leicht erhöhten Penetranz eines niedrig penetranten Karpelldefektes (*drnl-1*: 5%; *drn drnl-1*:15%) (Chandler, nicht veröffentlicht). Weder bei *drn* noch bei *drnl-1* handelt es sich jedoch um Null-Allele, somit ist eine gewisse Restaktivität der Proteine wahrscheinlich. Bei genauer Beobachtung der Expressionsmuster zeigt sich auch während der Blütenentwicklung mehrfach partielle Überlappung der beiden Gene. Während der Rekrutierung der Zellen für die medialen Sepalen überschneiden sich die beiden Expressionsdomänen, und auch die beiden morphogenen Felder, die später zu den Petalen- und Stame-

nanlagen differenzieren liegen sehr dicht neben, bzw. partiell in der Peripherie des FM's. Die Zellen zur Bildung der Karpelle werden direkt im Zentrum des jungen Blütenprimordiums aus dem FM rekrutiert und damit aus dem Zentrum der *DRN* Expressionsdomäne. Somit wäre denkbar, dass *DRN* möglicherweise die *drnl-2/bcm-1* Mutante vor weiteren floralen Defekten rettet. Die Musterbildung der Stamenanlagen scheint, verglichen zu den anderen Blütenorganen bei weitem die Komplexeste zu sein. Die lateralen Stamen müssen entweder aus einem gemeinsamen morphogenen Petalen-Stamen-Feld abgegrenzt werden, oder auf engstem Raum zwischen den beiden morphogenen Feldern initiiert werden. Die medialen Stamen entstehen aus einer zunächst ringförmigen Expressionsdomäne, die sich im weiteren Verlauf auftrennen muss, um vier einzelne Organanlagen zu bilden. Vielleicht können diese hoch-komplexen Prozesse, im Gegensatz zur Bildung der anderen Organe nicht von einem funktionell equivalentem Protein mit teilweise überlappender Expressionsdomäne übernommen werden, sondern sind auf eine sehr genau Expression angewiesen. Dadurch ließe sich das Fehlen der lateralen, und die Fusionen der medialen Stamen mit Hilfe der Expressionsmuster zumindest teilweise erklären. Interessant wäre in dem Zusammenhang die Analyse der *drn drnl-2* Doppelmutante, um eventuelle weitere Blütendefekte zu entdecken.

Nur an zwei Zeitpunkten während der Entwicklung der Pflanze konnte *DRN* Expression außerhalb des Meristems detektiert werden. Während der Etablierung des embryonalen SAMs, welches bereits im Globulä stadium durch *WUS* und *STM* vormarkiert wird, ist *DRN* zunächst lateral des entstehenden SAMs lokalisiert, später kann Expression weiterhin in den Kotyledonenspitzen detektiert werden. Außerdem markieren *STM* und *WUS* schon ab Stadium 1 bzw. 2 der Blütenentwicklung das FM im Zentrum des Primordiums vor, während *DRN* nicht, oder an distaler Position exprimiert wird. *DRN* wird also in neu entstehenden Meristemen deutlich später exprimiert, als die Meristemmarker *WUS* und *STM*, was darauf hindeutet, dass *DRN* keine Rolle für die Etablierung des Meristems spielt, sondern eher eine Funktion bei der Aufrechterhaltung besitzt. *DRNL* hingegen ist schon in früheste Musterbildungsprozesse lateraler Organe involviert.

### **4.3 Die frühe Regulation von *DRNL* erfolgt unabhängig von Auxin**

Im Rahmen dieser Arbeit sollte darüber hinaus eine mögliche Verbindung zwischen dem Phytohormon Auxin und *DRNL* überprüft werden. Obwohl durch konstitutive Überexpression von *DRN* und *DRNL* eine Verknüpfung mit Cytokinin beobachtet werden konnte (Banno et al., 2001; Ikeda et al., 2006), ist eine Einordnung der beiden Paraloge in den Auxin-Signalweg auf Grund verschiedenster Beobachtungen deutlich näher-

liegend. Außerdem ist die Bildung lateraler Organe, in die *DRNL* involviert zu sein scheint, abhängig vom polaren Auxin-Transport in die inzipienten Organanlagen (Reinhardt et al., 2003).

Die Promotoren beider Gene enthalten mehrere kanonische *Auxin-Response Elements* (*AuxREs*). Der *DRN*-Promotor enthält insgesamt fünf *AuxREs*, davon drei 3' und zwei 5' vom Transkriptionsstart. Im *DRNL*-Promotor befinden sich ebenfalls drei *AuxREs* 3' vom Transkriptionsstart gelegen und eins 5'. An diese *AuxREs* binden Mitglieder einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die ARFs und aktivieren oder reprimieren damit die Transkription Auxin-regulierter Gene (Guilfoyle et al., 1998; Guilfoyle, 2007). Die 23 Mitglieder der ARF-Familie sind in eine Reihe von Entwicklungsprozessen involviert. *MONOPTEROS (MP)/ARF5* ist essentiell für die Festlegung der basalen Domäne während der Embryogenese (Berleth and Jurgens, 1993; Hardtke and Berleth, 1998). *DRN* konnte bereits als direktes Zielgen von MP identifiziert werden (Cole et al., 2009). In der *mp* Mutante ist der *DRN*-Promotor in den Spitzen der Kotyledonen ab dem Torpedostadium in phänotypisch mutanten Embryonen inaktiv. Die Expression von *DRN* im SAM ist davon nicht betroffen. Durch Punktmutation einzelner *AuxREs* des Promotors und durch ChIP-Experimente konnte belegt werden, dass MP mit zwei der 5' gelegenen kanonischen *AuxREs* physisch interagiert. Die Expression des paralogen *DRNL* ist in der *mp*-Mutante ebenfalls betroffen. Es konnte kein Signal in den Kotyledonenspitzen phänotypisch mutanter *mp* Pflanzen im Torpedostadium detektiert werden. Außerdem wurde ein signifikanter Anteil an Embryonen innerhalb der homozygoten *pDRNL::erGFP* Linien beobachtet, die auch in früheren Stadien kein Signal zeigten. *DRNL* scheint also ebenfalls durch MP reguliert zu werden, und zwar schon in früheren Entwicklungsstadien als *DRN*. Allerdings zeigten die Reportergeren-Linien mit den mutierten *AuxREs* im *DRNL*-Promotor kein verändertes Expressionsmuster in Embryonen. Die Kontrolle von *DRNL* durch MP während der Kotyledonenentwicklung könnte damit entweder indirekt sein, oder über nicht-kanonische *AuxREs* reguliert werden. Die Interaktion von MP mit nicht-kanonischen *AuxREs* konnte auf der Suche nach direkten Zielgenen durch *ChIP* nachgewiesen werden (Schlereth et al., 2010). MP bindet an ein 500 BP großes Fragment des *TMO7*-Promotors, der keine kanonischen *AuxREs* (TGTCTC) beinhaltet. Allerdings finden sich zwei TGTC Kernelemente, die für die Interaktion von MP mit dem Promotorbereich verantwortlich sein könnten. Somit wäre denkbar, dass MP auch alternative Motive innerhalb des *DRNL*-Promotors erkennt, und die Transkription damit direkt reguliert. Für die Spezifizierung von Gründerzellen zur Bildung der Kotyledonen im globulären Embryo durch Auxin gibt es derzeit allerdings keine Beweise. Lokale Auxin-Maxima können in den Kotyledonenprimordien ab dem Herzstadium nachgewiesen werden, und koinzidieren damit mit den Mustern von *DRN* und *DRNL* und dem Auswachsen der Organanlage. Die Rekrutierung der Gründerzellen muss allerdings deutlich früher erfolgen. Auxin ist zu Beginn der Embryogenese gleichmäßig

über den kompletten Proembryo verteilt, ähnlich wie DRN und DRNL, ab dem späten Globulär- (etwa 32-Zell-Stadium), über das Triangulärstadium hinweg akkumuliert Auxin in der Hypophyse und der obersten Suspensorzelle (Friml et al., 2003). Da die Kotelonengründerzellen innerhalb dieses Zeitfensters festgelegt werden müssen, erscheint Auxin als Initiator eher unwahrscheinlich.

Die Auxinverteilung in Infloreszenz und Blüten ist im Vergleich zum Embryo relativ spärlich dokumentiert. Lokale Maxima können in der Peripherie des IMs detektiert werden, an den Stellen an denen die Blütenprimordien initiiert werden (Heisler et al., 2005). In jungen Blütenprimordien konnte bislang mit Hilfe des *DR5*-Promotors kaum Auxin detektiert werden, dafür allerdings durch Antikörperfärbung konjugierte, biologisch inaktive IAA-Derivate nachgewiesen werden (Aloni et al., 2006). Freies Auxin konnte erst ab Stadium 8 in allen Blütenorganen detektiert werden. Die Analyse der *pDR5::erGFP* Reporterger-Linien in Rahmen dieser Arbeit ergab davon abweichend ein sehr komplexes Muster von lokalen Auxinmaxima in allen Stadien der Blütenentwicklung. Schon in den inzipienten Primordien fast aller Blütenorgane konnte die Akkumulation von Auxin beobachtet werden, allerdings immer deutlich nachdem die Organanlagen von DRNL vorgemustert wurden. Meist kommt es unmittelbar nach der Etablierung eines Auxin-Maximums zu Auswachsen der Organanlage. Im Falle der Petalen kann erst nachdem diese bereits differenzieren ein apikales Maximum beobachtet werden. Während der Blütenentwicklung kann also davon ausgegangen werden, dass Auxin eher die Proliferation der bereits spezifizierten Gründerzellen fördert und damit die Bildung von Organanlagen unterstützt. Außerdem scheint Auxin involviert in Differenzierungsprozesse der Organe.

Einen weiteren Grund zur Annahme einer von Auxin weitestgehend unabhängigen Transkription von *DRNL* während der floralen Entwicklung liefert die Analyse der *mutDRNL::erGFP* Linien. Es konnte gezeigt werden, dass die Mutagenisierung der *AuxREs* im *DRNL*-Promotor auch in der Infloreszenz kaum Effekt auf die Aktivität des Promotors hat. Lediglich die L1-Schicht der medialen Sepalen ist in einem sehr kurzen Zeitfenster betroffen. In diesem Stadium akkumuliert Auxin stark in der L1 der medialen Sepalen, was auf die transkriptionelle Regulation von *DRNL* über Auxin-Signalwege in diesen Zellen deuten könnte. Allgemein betrachtet ist der sichtbare Beitrag in der Blütenentwicklung aber marginal, da er sich auf wenige Zellen beschränkt und zu einem Zeitpunkt erfolgt, zu dem es bereits zur Differenzierung der Organanlage kommt. Die Analyse einer *pDRNL::GUS* Reportergerlinie in den Verlustmutanten verschiedener, in Blüten exprimierten ARFs (*arf-1*, *arf-2*, *arf-6* und *arf-8*) ergab kein verändertes Muster für *DRNL*, was eine Auxin-regulierte Kontrolle von *DRNL* durch diesen Faktoren unwahrscheinlich macht (Nag et al., 2007). Die transkriptionelle Kontrolle von *DRNL* durch ARFs in Blüten, wie im Embryo durch MP, ist aber dennoch nicht auszuschließen. Möglicherweise sind diese ARFs hoch redundant, was die Analyse der

Muster in Tripel- bzw. Quadrupelmutanten erfordert oder *DRNL* wird durch andere ARFs reguliert. Allerdings ist die Rekrutierung von Gründerzellen für Blütenorgane über Auxin-Signalwege eher unwahrscheinlich. Wie bei der Determination der apikalen Domäne während der Embryogenese scheint Auxin auch für die Entwicklung von reproduktiver Organen höchstens in die Differenzierung selbiger involviert zu sein.

#### **4.4 Die Funktion von DRN und DRNL als mögliche Transkriptionsfaktoren**

Einer der Hauptpunkte dieser Arbeit war der Nachweis direkter Protein-DNA-Interaktion der beiden AP2-Proteine mit einem spezifischen Motiv. In der derzeitigen Literatur wird die AP2-Familie als Familie von Transkriptionsfaktoren beschrieben und es erfolgt eine Einteilung in verschiedene Subfamilien, mit untereinander variierender Sequenzspezifität, auf der Basis der AS-Sequenz ihrer AP2-Domänen. Obwohl die AP2-Familie mit 147 Mitgliedern eine der größten TF-Familien in *Arabidopsis* darstellt, ist nur wenig bekannt bezüglich der DNA-bindenden Eigenschaften und eventueller Zielgene ihrer Mitglieder.

Die Einteilung von DRN und DRNL in die B-1 Gruppe der ERF-Subfamilie lässt die spezifische Erkennung der klassischen GCC-Box, mit der Kernsequenz GCCGCC vermuten (Sakuma et al., 2002). Für AtERF1, einem Mitglied dieser Subfamilie, konnte bereits direkte DNA-Bindung der AP2-Domäne an dieses Motiv nachgewiesen werden, und die an der Interaktion beteiligten AS wurden mittels Kernspinresonanzspektroskopie aufgeklärt (Allen et al., 1998). DRN und DRNL unterscheiden sich innerhalb ihrer AP2-Domäne nur an wenigen Positionen von der ERF1 AP2-Domäne. Alle, an der spezifischen DNA-Bindung beteiligten AS stimmen zwischen ERF1, DRN und DRNL überein. Allerdings variieren ERF1 und DRN/DRNL bezüglich einer, an der unspezifischen Bindung beteiligten AS. An Position 12 der AP2-Domäne besitzt ERF-1 einen Lys-Rest, DRN und DRNL hingegen Arg. Die unspezifische Bindung einiger AS dieser Domäne an DNA soll vermutlich die spezifische Interaktion zwischen Protein und Zielsequenz erleichtern, indem der DNA-Strang in die richtige Position zur Protein gebracht wird (Allen et al., 1998). Da es sich sowohl bei Lys, als auch bei Arg um AS-Reste mit einer zusätzlichen positiven Ladung handelt, sollte diese AS-Substitution in DRN bzw. DRNL allerdings keine großen Auswirkungen auf die unspezifische Bindung von DNA haben. Jedoch konnte trotz größter Bemühungen keine spezifische Interaktion von DRN oder DRNL mit der GCC-Box gezeigt werden.

Die Gruppierung basierend auf Proteinsequenzen lässt nicht grundsätzlich Rückschlüsse auf die Interaktion mit dem klassischen Motiv zu. Für verschiedene Mitglieder der AP2-

Familie konnten bereits die Erkennung alternativer Zielsequenzen belegt werden (Koussevitzky et al., 2007). Die Mitglieder der AP2-Subfamilie erkennen, soweit bekannt, kein einheitliches Motiv, wobei außerdem unklar ist, ob beide AP2-Domänen an die Zielsequenz binden (Krizek et al., 2000). Auf der Suche nach alternativen Zielsequenzen von DRN und DRNL konnte allerdings ebenfalls kein Motiv identifiziert werden, an das DRN oder DRNL spezifisch binden.

Nach den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchsreihen kann die Interaktion von DRN und DRNL mit einer spezifischen Zielsequenz und damit eine mögliche Funktion als TF bisher nicht bestätigt werden. Auf der anderen Seite lässt sich aber auch nicht ausschließen, dass die beiden Proteine unter nativen Bedingungen mit einer spezifischen DNA-Sequenz interagieren. Denkbar wäre z.B. eine große Dissoziationskonstante des Komplexes bzw. eine niedrige Affinität des Proteins gegenüber der Zielsequenz, was einen Nachweis auf Grund der Instabilität äußerst schwierig machen würde. Für verschiedene ERFs konnte eine Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) für die GCC-Box im pikomolaren Bereich festgelegt werden (Hao et al., 1998), was eine hohe Affinität des Proteins gegenüber der Erkennungssequenz darstellt. Vergleichsweise besitzen bHLH-Faktoren mit einem typischen  $K_d$ -Wert im nanomolaren Bereich eine deutlich niedrigere Affinität (Hurst, 1994), der *LAC* Suppressor-Operator-Komplex ist mit einer  $K_d$  von 0,1 pM hingegen äußerst stabil (Riggs et al., 1970). Das als Kontrolle verwendete DREB1A zeigte in allen durchgeführten Experimenten erwartungsgemäß eine hohe Affinität gegenüber der Erkennungssequenz. Die Analyse der DNA-Bindeeigenschaft verschiedener HOX-Proteine (HOXA5, HOXA7, HOXB1, HOXB4 und HOXC8) ergab, trotz ihrer nahen Verwandtschaft, eine große Varianz bezüglich der Affinität und Spezifität (Pellerin, 1994). Somit wäre auch für DRN und DRNL eine deutlich niedrigere Affinität, als die anderer Mitglieder der AP2-Familie, trotz der hoch konservierten Sequenz der AP2-Domäne denkbar. Qualitative Unterschiede bezüglich der Protein-DNA-Interaktion konnten auch für verschiedene ERFs festgestellt werden (Ohme-Takagi, 2000). Während ERF1, ERF2 und ERF5 sehr sensitiv auf Punktmutationen innerhalb der GCC-Kernsequenz reagieren, sind ERF3 und ERF4 deutlich toleranter bezüglich einzelner Basenaustausche.

Durch die Interaktion von Transkriptionsfaktoren lässt sich die transkriptionelle Genregulation kontrollieren, indem die Spezifität der Zielsequenz und die Bindungsaffinität des Promotorelements beeinflusst werden (Blackwood and Eisenman, 1991; Sessa et al., 1993). KNOTTED1 (KN1), das Mais-Ortholog des HD-Proteins STM zeigt als Monomer kaum Bindung an die Erkennungssequenz. Erst in Form eines Heterodimers mit KNOTTED-INTERACTING-PROTEIN (KIP), einem weiteren HD-Protein bildet es einen stabilen Komplex mit dem spezifisches Motiv TGACAG(G/C)T (Smith et al., 2002). Homo- und Heterodimerisierungen werden auch für Mitglieder der ERF-Subfamilie angenommen (Riechmann and Meyerowitz, 1998). Tatsächlich wurde für

AtEBP Interaktion mit dem bZip-Faktor beobachtet (Buttner and Singh, 1997). Auch für DRN und DRNL konnte gezeigt werden, dass die beiden Proteine Heterodimere mit dem bHLH-Transkriptionsfaktor BIM1 und allen Mitgliedern der Klasse III HD-ZIP-Familie, bestehend aus PHAVOLUTA (PHV), PHABULOSA (PHB), REVOLUTA (REV), CORONA (CNA) und ATHB8 (Chandler et al., 2007; Chandler et al., 2009). Die Interaktion zwischen der c-terminalen *Per/Arnt/Sim (PAS)-like*-Domäne von HD-ZIP-Faktoren und DRN bzw. DRNL erfolgt über die AP2-Domäne. Allerdings konnte auch durch *in vitro* Koexpression von DRN mit BIM1 oder PHV keine spezifische DNA-Bindung an die GCC-Box erzeugt werden (nicht dargestellt). Möglicherweise ist aber auch die Multimerisierung mit anderen, bisher nicht identifizierten Transkriptionsfaktoren für die Aktivierung der beiden AP2-Faktoren nötig. Es könnten jedoch auch verschiedene Kofaktoren für die Interaktion mit der Zielsequenz benötigt werden, die die Konfirmation des Proteins beeinflussen und damit eine Protein-DNA-Interaktion ermöglichen. Denkbar wäre hingegen auch, dass es sich bei der AP2-Domäne von DRN und DRNL um eine Domäne mit rudimentär DNA-bindender Funktion handelt, und die beiden Proteine nicht direkt DNA binden, sondern die AP2-Domäne in dem Fall der Protein-Protein-Interaktion dient, und DRN und DRNL als Kofaktoren für z.B. PHV fungieren. Zwar konnte für BIM1 gezeigt werden, dass die Fähigkeit von BES1 zur Bindung an die spezifische Erkennungssequenz, durch die Heterodimerisierung mit BIM1 verstärkt wird, BIM1 interagiert vermutlich aber auch direkt mit einem spezifischen Motiv, der E-Box (Yin et al., 2005). Eventuell bilden DRN oder DRNL als Teilproteine mit BIM1 einen Komplex, der die E-Box erkennt.

Des Weiteren stellt sich die Frage, ob DRN und DRNL durch die *in vitro* Transkription überhaupt in nativer Form synthetisiert werden konnten. Die Verwendung rekombinanter Proteine für die DNA-Bindestudien könnte problematisch sein, da nicht garantiert werden kann, ob die exprimierten Proteine bezüglich Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur mit dem nativen Protein übereinstimmen. Zwar stellte sich das Kontrollprotein DREB1A in allen getesteten *in vitro* Transkriptions-Translations-Systemen als unproblematisch bezüglich der DNA-Protein-Interaktion heraus, für DRN und DRNL lässt sich allerdings keine Vorhersage treffen, ob die rekombinanten Proteine in nativer Form vorliegen. Außerdem werden posttranslationale Modifizierungen des Proteins, wie das Hinzufügen funktioneller Gruppen oder zusätzlicher Bindungen zwischen des AS in diesen *in vitro* Systemen vernachlässigt. Für OsEREBP1 aus Reis wurde die posttranskriptionale Phosphorylierung durch eine pathogen-induzierte *Mitogene Activated Proteine Kinase* (MAPK) nachgewiesen. Durch die Phosphorylierung erhöht sich die DNA-Bindeaktivität des AP2-TF deutlich (Cheong et al., 2003). Die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung über den MAPK-Weg ist nicht ungewöhnlich. Der Transkriptionsfaktor PBF1 bindet ausschließlich in phosphorylierter Form an den Promotor von *PR10a* (Despres et al., 1995). Auch für AtERF104 konnte

eine signifikant erhöhte Affinität des Protein nach der Phosphorylierung durch eine MAPK beobachtet werden (Bethke et al., 2009). Somit könnte auch die Aktivität von DRN und DRNL über posttranslationale Modifizierung, wie Phosphorylierung kontrolliert sein.

Bei der Analyse verschiedener AP2-TFs zeigte ein wichtiger Betrag, nicht nur der direkt mit der Zielsequenz interagierenden AS, sondern auch einiger anderer AS der AP2-Domäne. Die Position 14 scheint eine entscheidende Rolle für die Sequenzspezifität zu spielen, ohne direkten Kontakt zur Zielsequenz herzustellen (Sakuma et al., 2002). Möglicherweise beeinflusst ein in der ERF-Subgruppe hoch konservierter Ala-Rest die Konfirmation der Domäne durch die Interaktion mit Arg8 und Thr28 und beeinflusst damit die Bindeeigenschaft (Hao et al., 2002). Ala37 ist ebenfalls eine, innerhalb der gesamten Familie hoch konservierte AS, die als Teil der  $\alpha$ -Helix die DNA-Bindung nur indirekt beeinflusst. Der Ala-Rest an dieser Position ist allerdings essentiell für die Protein-DNA-Interaktion (Liu et al., 2006). Außerdem wird auch für die AS-Positionen 17, 27 und 42 ein bedeutender Einfluss auf die Konfirmation der AP2-Domäne angenommen (Yang et al., 2009). Innerhalb der  $\beta$ -Faltblatt-Domäne zeigt sich keine große Varianz der AS-Sequenz innerhalb der AP2-Familie, die  $\alpha$ -Helix hingegen gestaltet sich deutlich variabler. Somit wäre es denkbar, dass sich in diesem, für die Ausrichtung der DNA-bindenden AS, verantwortlichem Teil, in DRN und DRNL AS fehlen, die eine DNA-bindende Konfirmation unterstützen bzw. AS-Substitutionen vorliegen, die die Interaktion negativ beeinflussen.

Die AP2-Domäne ist jedoch nicht immer als völlig selbständige Struktur unabhängig vom umliegenden Proteinkontext zu definieren. Für EREBP2 aus *Nicotiana* konnte bereits ein entscheidender Beitrag der flankierenden Sequenz der AP2-Domäne festgestellt werden (Hao et al., 1998). Für die spezifische Interaktion mit der GCC-Box ist eine 10 AS lange Sequenz n-terminal der AP2-Domäne erforderlich, deren genaue Funktion bislang unklar ist. Dieser Bereich ist nicht konserviert innerhalb der AP2/ERF-Familie, weshalb eine Beeinflussung der Konfirmation der AP2-Domäne eher vermutet wird, als eine Beteiligung an der spezifischen Interaktion mit der Zielsequenz. Somit wären auch Domänen innerhalb der Proteinsequenz von DRN oder DRNL denkbar, die eine, sich auf die DNA-Bindung negativ auswirkende Konfirmation der AP2-Domäne bewirken, was den Verlust der Interaktion der DREB1A AP2-Domäne in den DRN-/DRNL-Chimären mit dem DRE-Motiv erklären könnte.

## 4.5 Die transkriptionelle Kontrolle durch DRNL und DRN

Die Interpretation der *microarray*-Daten erwies sich als äußerst kompliziert. Im Abgleich mit Datenbanken, dem *clustering* ergaben sich keine großartigen Übereinstimmung mit anderen Sets. Der Grund dafür liegt möglicherweise in der Produktion eines sehr diffizilen Datensets. Die meisten *microarray*-Daten basieren auf der Analyse kompletter Pflanzen bzw. Gewebetypen. Dabei werden die Reaktion auf biotischen oder abiotischen Stimulus erfasst, die Auswirkung von Mutationen auf die Genexpression oder differentielle Expression in verschiedenen Entwicklungsstadien oder Organen untersucht. In diesem Fall wurde durch die Sortierung die Transkription in nur einem, zudem wahrscheinlich höchst spezialisierter Zelltyp in Vergleich zu allen anderen Zellen der Kalluskultur analysiert. Die dabei entstandenen Daten lassen sich demnach nur schwer in die vorhandenen Daten, die durch die Analyse einer weit weniger definierten Population entspringen, einordnen.

Weiterhin ist fraglich in wie fern, die als differenziell transkribierten Gene auftauchen direkt von DRNL beeinflusst sind. Diese Zellen exprimieren schon über einen sehr langen Zeitraum vor der Sortierung GFP, und somit auch DRNL. Da es über diesen Zeitraum auch zur Differenzierung kommt, könnten die differenziell transkribierten Gene auch durch die allgemeine Entwicklung der Zellen beeinflusst sein, und nicht direkt in Abhängigkeit von DRNL reguliert werden. Außerdem ist auch fraglich, wie weit die Expression in der Kalluskultur mit der *in Planta* verglichen werden kann. Möglicherweise sind die DRNL positiven Zellen der Kalluskultur qualitativ nicht den primordialem Zellen, in denen DRNL in der Pflanze exprimiert wird, entsprechend.

Besonders auffällig bei der Analyse der *microarray*-Daten der DRNL-positiv sortierten Zellen war der stark überwiegende Anteil an negativ regulierten (420) im Vergleich zu positiv regulierten Genen (70). Die DRN basierten Datensets zeigen diesbezüglich mit 280 positiv und 210 negativ regulierten Genen keine große Diskrepanz. Denkbar wäre auf Grund dieser Daten eine Funktion als transkriptioneller Repressor für DRNL. NtERF3, AtERF3 und AtERF4 wurden bereits als aktive, transkriptionelle Repressoren beschrieben (Ohme-Takagi, 2000; Ohta et al., 2000). Für ERF3 wurde die negative Regulation zweier Ethylen regulierter Gene, *BCH* und *BGL* demonstriert (Yang et al., 2005). Außerhalb der AP2-Domäne konnte ein Motiv identifiziert werden, welches essenziell für die Funktion als Repressor erscheint, das *ERF-associated Amphiphilic Repression (EAR)*-Motiv mit der konservierten Sequenz L/FDNLL/F(X)P (Ohta et al., 2001). In *Arabidopsis* sind mit ERF3, ERF4 und ERF7 bis ERF12 bisweilen acht ERF-Repressoren identifiziert worden, die ein c-terminales *EAR*-Motiv besitzen (Yang et al., 2005). Eine solche Sequenz ist zwar weder in DRNL noch in DRN zu finden, allerdings sind alle bekannten ERF-Repressoren, genau wie DRN und DRNL Mitglieder der B1-Subgruppe der AP2-Familie (Sakuma et al., 2002). Da diese Einteilung auf Grund der

Homologie der AP2-Domäne erfolgt, und alle bekannten Repressoren dieser Subgruppe angehören, wäre auch ein Beitrag der AP2-Domäne, neben dem *EAR*-Motiv zur Funktion als transkriptioneller Repressor vorstellbar.

Der Vergleich mit zwei unabhängigen *microarrays*, basierend auf der Expression von *DRNL* ergab nur begrenzt Übereinstimmungen, was mit unter an dem verwendeten Gewebe liegen könnte. Für ein Experiment wurden transgene *35S::ESR2/DRNL-ER* Wurzel-Zellkulturen verwendet, die eine Stunde vor der RNA-Isolation induziert wurden (Ikeda et al., 2006). Die zweite Analyse erfolgte aus RNA aus Blättern von *35S::BOL/DRNL* transgenen Pflanzen (Marsch-Martinez et al., 2006). Beide Experimente beruhen damit auf konstitutiver Überexpression des AP2-Proteins, die *in Planta* verheerende Auswirkung auf die Konstitution der Pflanze hat. Außerdem wurden für beide Experimente Gewebetypen verwendet, in denen *DRNL* *in vivo* nicht exprimiert wird.

Da die konstitutive Überexpression von *DRNL* zu einer erhöhten Zellteilungsrate führt, vermuten Ikeda et al. eine Aktivierung von Genen durch *DRNL*, die als positive Regulatoren des Zellzyklus fungieren, z.B. *CycD1;1* (Ikeda et al., 2006). In diesem Experiment wurde außerdem *CUC1* als direktes Zielgen identifiziert, welches eine synergistische Wirkung mit *DRN* bezüglich der Kotyledonen- (Chandler, 2010) und Stamenentwicklung zeigt. In dem, im Rahmen dieser Arbeit erstellten Datenset taucht *CUC1* jedoch nicht als durch *DRNL* transkriptionell reguliert auf. Allerdings finden sich in den Datensets zwei andere Übereinstimmungen, ein Mitglied der UDP-Glukuronosyltransferase (UDP-GT)-Familie und einem Mitglied der WD40-Familie. Die in beiden Experimenten positiv regulierte Transferase (AT1g73880) ist leider nicht genauer charakterisiert, die UDP-GT UGT84B1 katalysiert nachweislich die Glykolyisierung von IAA (Jackson et al., 2002). Ein ähnlicher Eingriff in die Auxinhomöostase wäre somit prinzipiell auch für AT1g73880 denkbar. Die WD40-Domäne vermittelt vermutlich Interaktion mit anderen Protein-Domänen (van der Voorn and Ploegh, 1992; Smith et al., 1999; Choi et al., 2008). Proteine mit einer WD40-Domäne sind weit verbreitet in allen Spezies der Eukaryoten, wobei die Funktion der Mitglieder dieser Familie äußerst variabel gestaltet (Smith et al., 1999). Die Funktion des WD40-Proteins At1g48870 ist bisher nicht bekannt.

Die *bol-D* Mutante und die *35S::BOL* überexprimierenden transgenen Pflanzenlinien zeigten eine, verglichen zum Wildtyp bis zu sechsfach reduzierte Zellteilungsrate und -elongation (Marsch-Martinez et al., 2006). Die Expression verschiedener Komponenten des Nukleosoms und der Ribosomen zeigten sich von der *DRNL*-Überexpression beeinflusst, was einen Eingriff in die Regulation des Zellzyklus vermuten lässt. Weiterhin wurden diverse mit verschiedenen Hormonen assoziierte Gene differentiell transkribiert. Besonders interessant ist dabei *IAA17/AXR3*, welches in der *DRNL*-positiven

Zellpopulation ebenfalls als negativ reguliert auftaucht. Die Expression von AUX/IAAs wird von Auxin induziert (Abel and Theologis, 1996) und die Proteine können Homo- und Heterodimere bilden (Kim et al., 1997). Außerdem interagieren sie mit ARFs, die über die Interaktion mit *AuxREs* die Transkription von Auxin-induzierbaren Genen kontrollieren (Ulmasov et al., 1997, 1999). IAA17/AXR3 wird als transkriptionaler Repressor Auxin-induzierbarer Gene beschrieben (Ouellet et al., 2001; Tiwari et al., 2001; Leyser, 2002; Guilfoyle and Hagen, 2007), die Repression von *IAA17/AXR3* durch DRNL würde die Transkription von Auxin-induzierbaren Genen somit positiv beeinflussen.

Die Identifizierung von einzelnen Zielgenen von DRN und DRNL, oder die Einordnung der beiden Proteine in bestimmte biologische Prozesse gestaltet sich schwierig. Die Funktion von DRN und DRNL als Transkriptionsfaktoren bzw. eine direkte Interaktion mit einer spezifischen DNA-Sequenz konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht belegt werden, auch wenn für DRN eine Bindung an die GCC-Box beobachtet werden konnte (Banno H., 2006). In den Datensets der *microarrays* treten eine Vielzahl von Genen auf, die in die Auxin-Homöostase oder -Signaltransduktion eingreifen. Durch die *pDRNL::erGFP* Reporter-gen-Linien konnte gezeigt werden, dass die DRNL-Expression teilweise mit Auxin-Maxima korreliert, aber auch in verschiedenen Organanlagen zu einem deutlich früheren Zeitpunkt detektierbar ist. Denkbar wäre unter dieser Voraussetzung, dass DRNL die Auxin-Verteilung beeinflusst. Die IAA-Amido-Synthetase *GH3.9* ist in DRNL positiven Zellen negativ reguliert. IAA-Amido-Synthetasen binden freies Auxin, durch die Konjugation von AS an IAA (Staswick et al., 2005; Khan and Stone, 2007). Eine mögliche Repression von *GH3.9* durch DRNL könnte somit zur Etablierung lokaler Maxima in den DRNL-positiven Zellen führen, indem freies Auxin in DRNL-negativen Zellen durch *GH3.9* konjugiert wird, in den DRNL-positiven Zellen hingegen nicht. Die Transkription von *ITAMI*, eine S-Adenosylmethionin-abhängige Methyltransferase, die durch die Methylierung von IAA zu Methyl-IAA-Estern (Me-IAA) in die Auxin-Homeostase eingreift (Qin et al., 2005), wird in DRN- und DRNL-positiven Zellen positiv reguliert. Im Gegensatz zu AS konjugierten Auxin-Derivaten sind MeIAA nicht biologisch inaktiv, in Applikationsexperimenten mit MeIAA zeigte die modifizierte Form sogar eine höhere biologische Potenz (Zimmerman, 1937). Die Inaktivierung von freiem Auxin in der Peripherie und einer Steigerung der Aktivität von Auxin in der DRNL-exprimierenden Zellen könnten zur Etablierung stabiler und lokaler Auxin-Maxima in den DRNL-positiven Zellen führen, was sekundär die Expression einiger Auxin regulierter Gene beeinflussen könnte, wie *ARF10*, *ARF17* und *ARF19* oder *AXR3/IAA17*. Eine Verwicklung von DRN und DRNL in die Auxin-Homöostase muss zu diesem Zeitpunkt allerdings als rein spekulativ angesehen werden. Eventuell könnten weitere *microarray*-Datensets von DRN und DRNL in mutantem Hintergrund, wie DRNL in der *pt* Mutante, oder DRN und DRNL in *drn* und *drnl* weiteren Auf-

schluss über die biologische Funktion der beiden Proteine geben und die Identifizierung möglicher Zielgene unterstützen. Die Verwendung eines induzierbaren Systems würde zudem eine Beschränkung auf primäre Zielgene ermöglichen.

## Zusammenfassung

Mit Hilfe transkriptionaler und translationaler Reportergergenkonstrukte wurde das Expressionsmuster von *DRNL* über die verschiedenen Entwicklungsstadien von *Arabidopsis thaliana* hinweg analysiert. Die Verwendung doppelt transgener Reportergergenlinien erlaubte einen detaillierten Vergleich der Muster mit denen des nächstverwandten Protein DRN.

Die beiden homologen Proteine werden im globulären Embryo zunächst koexprimiert, während späterer Stadien der Embryogenese unterscheiden sich die Expressionsmuster deutlich. Im weiteren Verlauf der Pflanzenentwicklung wird *DRN* hauptsächlich in Zellen mit meristematischem Charakter exprimiert. *DRNL* hingegen ist in verschiedene Stadien der Organogenese involviert. Dabei markiert *DRNL* zunächst die aus dem SAM, IM und FM zur Bildung lateraler Organe rekrutierten Gründerzellen, die proliferierenden Zellen inzipienter Organanlagen und schließlich eine Teilpopulation in den Primordien. Die Expressionsmuster während der Blütenentwicklung zeigten, dass die einzelnen floralen Organtypen durch grundlegend verschiedene Musterbildungsprozesse entstehen. Die Sepalen werden dekussiert, oder die medialen Sepalen einzeln und die lateralen Sepalen paarweise, genau wie die Karpelle, angelegt. Die Petalen und lateralen Stamen und die medialen Stamen entstehen aus morphogenen Feldern, die sich in distinkte Organanlagen auftrennen. Im Zentrum des Blütenprimordiums kommt es mehrfach zu Überlappung mit *DRN*.

Die Beobachtung der Auxin-Verteilung in der Infloreszenz, gemessen mit dem *DR5*-Promotor, zeigten lokale Maxima in allen Organanlagen, jedoch zu einem deutlich späteren Zeitpunkt als *DRNL*-Expression detektiert werden konnte. Die Mutagenese von vier kanonischen *AuxREs* zeigte ebenfalls keinen sichtbaren Betrag bezüglich der Regulation von *DRNL* während der frühen Organogenese. Die Rekrutierung von Organgründerzellen durch *DRNL* und die Bildung inzipienter Organanlagen scheint somit unabhängig von Auxin zu sein.

*DRN* und *DRNL* kodieren Transkriptionsfaktoren der AP2/ERF-Familie, in DNA-Bindestudien konnte allerdings keine spezifische Bindung der *in vitro* synthetisierten Proteine an eine Zielsequenz nachgewiesen werden. In *microarray*-Experimenten konnte eine Reihe von, mit Auxin assoziierten Gene als differentiell transkribiert identifiziert werden. Ein Eingriff in die Auxin-Homöostase ist somit denkbar, aber zum jetzigen Zeitpunkt spekulativ.

## Abstract

Live imaging in *Arabidopsis thaliana* during plant development revealed *DRNL* and its paralogue *DRN* to be coexpressed during early embryogenesis, whereas expression patterns diverge during later stages of embryogeny. Whilst plant development proceeds, *DRN* expression is mainly restricted to meristematic cells. *DRNL* participates in all phases of lateral organ formation, pre-patterning lateral organ founder cells, incipient organ anlagen and primordial cells. Analysis of *DRNL* expression patterns during floral development revealed floral organ initiation to occur in different modes, from individual or pairs of organ anlagen or decussate for sepals, to morphogenetic fields pre-patterning petals and lateral stamens, or the medial stamens, to pairwise for carpells. *DRNL* function repeatedly overlaps in the central stem cell zone with that of *DRN*.

Measurement of auxin response maxima in inflorescences by the *DR5* reporter revealed auxin distribution in floral organ anlagen following *DRNL* expression. Mutagenesis of four canonical *AuxREs* in the promoter demonstrated regulation of *DRNL* to be unaffected during early organogenesis. Specification of organ founder cells and controlled cell division forming an organ anlage seem independent of auxin signalling.

*DRN* und *DRNL* encode transcription factors belonging to the AP2/ERF family, however DNA binding of *in vitro* synthesised protein to a specific motif was not demonstrated. *Microarray* experiments revealed differential transcription of several auxin related genes. Function in auxin homeostasis, although not substantiated, appears to be conceivable.



DRN

PEST-find: Finds PEST motifs as potential proteolytic cleavage sites.

4 PEST motifs were identified in ESR1\_ARATH  
from positions 1 to 328 and sorted by score.

Poor PEST motif with 34 amino acids between position 197 and 232.  
197 KTACVSYSENENNESFFPEESDGTGLLQEVVQEFLLK 232  
PEST score: 0.72

Poor PEST motif with 11 amino acids between position 22 and 34.  
22 KFFTEPTASPVSR 34  
PEST score: -6.10

Poor PEST motif with 22 amino acids between position 137 and 160.  
137 RCPLPSLPLDSSTQNFYGAAPAAQR 160  
PEST score: -9.08

Poor PEST motif with 14 amino acids between position 109 and 124.  
109 RTNFTYPTAVIMPEPR 124  
PEST score: -9.77

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1 MEKALRNFTTESTHSPDPNPLTKFFTEPTASPVSRNRKLSKDTTVTIAGAGSSTTRYRGV 60
      OOOOOOOOOO

61 RRRPWGRYAAEIRDPMSKERRWLGTFTAEQAACAYDSAARAFRGAKARTNFTYPTAVIM 120
      OOOOOOOOOO

121 PEPRFSFSNKKSSPSARCPLPSLPLDSSTQNFYGAAPAAQRIYNTQSIFLRDASCSSRKT 180
      OO          OOOOOOOOOOOOOOOOOOOO

181 PYNNSFNGSSSSYSASKTACVSYSENENNESFFPEESDGTGLLQEVVQEFLLKKNRGVPPS 240
      OOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOO

241 PPTPPPVTSHHDNSGYFSNLTIYSENMVQETKETLSKLDRYGNFQANDDGVRVADGGL 300

301 SLGSNEWGYQEMLMYGTQLGCTCRRSWG 328
    
```

Symbols	PEST motifs
++++++	potential
OOOOOO	poor



Accession	Name	7.37	8.32	-0.95	1.26E-6	8.11	9.13	-1.02	7.14E-7	7.74	8.72	-0.99	1.31E-6
AT13G02885	GAS5, gibberellin-regulated protein 5 (GAS5), gibberellin-responsive protein 5	7.37	8.32	-0.95	1.26E-6	8.11	9.13	-1.02	7.14E-7	7.74	8.72	-0.99	1.31E-6
AT1G11000	MLO4, calmodulin binding, seven transmembrane MLO family protein	7.99	8.84	-0.95	1.9E-6	8.74	9.32	-1.08	4.4E-8	8.36	9.28	-1.01	3.9E-7
AT2G27190	PAP1 (PURPLE ACID PHOSPHATASE 1), hydrolase, protein serine/threonine phosphatase	7.28	8.23	-0.95	1.61E-6	7.46	8.33	-0.87	1.91E-6	7.37	8.28	-0.91	3.7E-5
AT1G527050	nucleic acid binding / transcription factor, homeobox-leucine zipper family protein	8.33	9.27	-0.94	2.4E-6	8.88	9.82	-0.84	1.2E-6	8.51	9.05	-0.54	1.0E+0
AT1G557830	CIPK21 (CBL-interacting protein kinase 21), ATP binding / protein serine/threonine kinase	6.69	7.62	-0.93	3.0E-6	6.88	7.72	-0.86	1.0E+0	6.78	7.67	-0.89	9.6E-5
AT1G45590	ATSEN1 (SPLICING ENDONUCLEASE 1), RNA-intron endonuclease, unknown protein	7.41	8.35	-0.93	3.1E-6	7.83	9.07	-1.24	1.54E-11	7.62	8.71	-1.09	1.1E-8
AT1G77120	ADH1 (ALCOHOL DEHYDROGENASE 1), alcohol dehydrogenase	8.47	9.40	-0.93	3.4E-6	9.81	10.74	-0.92	4.8E-5	9.14	10.07	-0.93	1.3E-8
AT5G44070	CAD1 (CADMIUM SENSITIVE 1), phytochelatin synthase 1 (PCS1)	8.38	9.50	-0.93	4.3E-6	8.53	9.09	-0.56	1.0E+0	8.30	9.30	-0.74	2.4E-2
AT1G52700	the class III iron binding, iron oxidase/iron oxidase/oxygen binding	8.65	9.65	-0.92	5.2E-6	9.17	10.17	-0.77	0.0E+0	9.17	10.17	-0.77	0.0E+0
AT4G38950	ALDH8F1, aldehyde dehydrogenase oxidoreductase	7.13	8.07	-0.92	6.1E-6	7.25	8.68	-1.51	8.6E-8	7.15	8.36	-1.21	1.0E+0
AT1G09650	WRKY14, transcription factor	7.18	8.08	-0.90	1.3E-5	7.09	7.91	-0.74	1.49E-2	7.09	7.91	-0.82	1.3E-3
AT2G25490	EBF1 (EIN3-BINDING F-BOX PROTEIN 1), ubiquitin-protein ligase, F-box family protein	9.59	10.47	-0.88	3.8E-5	10.28	10.17	0.11	1.0E+0	9.93	10.32	-0.39	1.0E+0
AT4G23190	CRK11 (CYSTEINE-RICH RLK11), kinase, protein kinase family protein	6.99	7.86	-0.87	4.9E-5	7.10	7.70	-0.59	7.7E-8	7.05	7.78	-0.73	3.1E-2
AT1G520375	CP11 (CYCLOPROPYL ISOMERASE), cyclopropyl isomerase (CPI1)	7.40	8.27	-0.87	5.7E-5	7.18	8.27	-1.08	4.0E-8	7.29	8.27	-0.98	2.14E-6
AT2G38940	ATP2 (PHOSPHATE TRANSPORTER 2), carboxylate transporter/phosphate transporter	6.47	7.33	-0.87	5.7E-5	6.83	7.78	-0.95	1.5E-5	6.65	7.56	-0.91	3.9E-5
AT3G60140	DNZ (DARK INDUCIBLE 2), hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds	8.03	8.90	-0.87	5.9E-5	8.07	8.50	-0.77	1.8E-2	8.78	8.70	-0.82	1.91E-3
AT5G10480	PAS2 (PASTICINO 2), protein tyrosine phosphatase-like protein, putative (PAS2)	8.32	9.18	-0.87	6.1E-5	8.07	9.04	-0.97	6.91E-6	8.19	9.11	-0.92	2.8E-5
AT3G17210	FAZ2 (FATTY ACID DESATURASE 2), delta12-fatty acid dehydrogenase	10.75	11.61	-0.87	6.2E-5	10.69	11.77	-1.08	5.9E-8	10.72	11.69	-0.97	2.6E-6
AT1G52700	the class III iron binding, iron oxidase/iron oxidase/oxygen binding	8.65	9.65	-0.86	6.3E-6	9.17	10.17	-0.77	0.0E+0	9.17	10.17	-0.77	0.0E+0
AT1G26450	ALDH8F1, aldehyde dehydrogenase oxidoreductase	7.13	8.07	-0.92	6.1E-6	7.25	8.68	-1.51	8.6E-8	7.15	8.36	-1.21	1.0E+0
AT1G19660	WRKY14, transcription factor	7.18	8.08	-0.90	1.3E-5	7.09	7.91	-0.74	1.49E-2	7.09	7.91	-0.82	1.3E-3
AT2G25490	EBF1 (EIN3-BINDING F-BOX PROTEIN 1), ubiquitin-protein ligase, F-box family protein	9.59	10.47	-0.88	3.8E-5	10.28	10.17	0.11	1.0E+0	9.93	10.32	-0.39	1.0E+0
AT4G23190	CRK11 (CYSTEINE-RICH RLK11), kinase, protein kinase family protein	6.99	7.86	-0.87	4.9E-5	7.10	7.70	-0.59	7.7E-8	7.05	7.78	-0.73	3.1E-2
AT1G520375	CP11 (CYCLOPROPYL ISOMERASE), cyclopropyl isomerase (CPI1)	7.40	8.27	-0.87	5.7E-5	7.18	8.27	-1.08	4.0E-8	7.29	8.27	-0.98	2.14E-6
AT2G38940	ATP2 (PHOSPHATE TRANSPORTER 2), carboxylate transporter/phosphate transporter	6.47	7.33	-0.87	5.7E-5	6.83	7.78	-0.95	1.5E-5	6.65	7.56	-0.91	3.9E-5
AT3G60140	DNZ (DARK INDUCIBLE 2), hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds	8.03	8.90	-0.87	5.9E-5	8.07	8.50	-0.77	1.8E-2	8.78	8.70	-0.82	1.91E-3
AT5G10480	PAS2 (PASTICINO 2), protein tyrosine phosphatase-like protein, putative (PAS2)	8.32	9.18	-0.87	6.1E-5	8.07	9.04	-0.97	6.91E-6	8.19	9.11	-0.92	2.8E-5
AT3G17210	FAZ2 (FATTY ACID DESATURASE 2), delta12-fatty acid dehydrogenase	10.75	11.61	-0.87	6.2E-5	10.69	11.77	-1.08	5.9E-8	10.72	11.69	-0.97	2.6E-6
AT1G52700	the class III iron binding, iron oxidase/iron oxidase/oxygen binding	8.65	9.65	-0.86	6.3E-6	9.17	10.17	-0.77	0.0E+0	9.17	10.17	-0.77	0.0E+0
AT1G26450	ALDH8F1, aldehyde dehydrogenase oxidoreductase	7.13	8.07	-0.92	6.1E-6	7.25	8.68	-1.51	8.6E-8	7.15	8.36	-1.21	1.0E+0
AT1G19660	WRKY14, transcription factor	7.18	8.08	-0.90	1.3E-5	7.09	7.91	-0.74	1.49E-2	7.09	7.91	-0.82	1.3E-3
AT2G25490	EBF1 (EIN3-BINDING F-BOX PROTEIN 1), ubiquitin-protein ligase, F-box family protein	9.59	10.47	-0.88	3.8E-5	10.28	10.17	0.11	1.0E+0	9.93	10.32	-0.39	1.0E+0
AT4G23190	CRK11 (CYSTEINE-RICH RLK11), kinase, protein kinase family protein	6.99	7.86	-0.87	4.9E-5	7.10	7.70	-0.59	7.7E-8	7.05	7.78	-0.73	3.1E-2
AT1G520375	CP11 (CYCLOPROPYL ISOMERASE), cyclopropyl isomerase (CPI1)	7.40	8.27	-0.87	5.7E-5	7.18	8.27	-1.08	4.0E-8	7.29	8.27	-0.98	2.14E-6
AT2G38940	ATP2 (PHOSPHATE TRANSPORTER 2), carboxylate transporter/phosphate transporter	6.47	7.33	-0.87	5.7E-5	6.83	7.78	-0.95	1.5E-5	6.65	7.56	-0.91	3.9E-5
AT3G60140	DNZ (DARK INDUCIBLE 2), hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds	8.03	8.90	-0.87	5.9E-5	8.07	8.50	-0.77	1.8E-2	8.78	8.70	-0.82	1.91E-3
AT5G10480	PAS2 (PASTICINO 2), protein tyrosine phosphatase-like protein, putative (PAS2)	8.32	9.18	-0.87	6.1E-5	8.07	9.04	-0.97	6.91E-6	8.19	9.11	-0.92	2.8E-5
AT3G17210	FAZ2 (FATTY ACID DESATURASE 2), delta12-fatty acid dehydrogenase	10.75	11.61	-0.87	6.2E-5	10.69	11.77	-1.08	5.9E-8	10.72	11.69	-0.97	2.6E-6
AT1G52700	the class III iron binding, iron oxidase/iron oxidase/oxygen binding	8.65	9.65	-0.86	6.3E-6	9.17	10.17	-0.77	0.0E+0	9.17	10.17	-0.77	0.0E+0
AT1G26450	ALDH8F1, aldehyde dehydrogenase oxidoreductase	7.13	8.07	-0.92	6.1E-6	7.25	8.68	-1.51	8.6E-8	7.15	8.36	-1.21	1.0E+0
AT1G19660	WRKY14, transcription factor	7.18	8.08	-0.90	1.3E-5	7.09	7.91	-0.74	1.49E-2	7.09	7.91	-0.82	1.3E-3
AT2G25490	EBF1 (EIN3-BINDING F-BOX PROTEIN 1), ubiquitin-protein ligase, F-box family protein	9.59	10.47	-0.88	3.8E-5	10.28	10.17	0.11	1.0E+0	9.93	10.32	-0.39	1.0E+0
AT4G23190	CRK11 (CYSTEINE-RICH RLK11), kinase, protein kinase family protein	6.99	7.86	-0.87	4.9E-5	7.10	7.70	-0.59	7.7E-8	7.05	7.78	-0.73	3.1E-2
AT1G520375	CP11 (CYCLOPROPYL ISOMERASE), cyclopropyl isomerase (CPI1)	7.40	8.27	-0.87	5.7E-5	7.18	8.27	-1.08	4.0E-8	7.29	8.27	-0.98	2.14E-6
AT2G38940	ATP2 (PHOSPHATE TRANSPORTER 2), carboxylate transporter/phosphate transporter	6.47	7.33	-0.87	5.7E-5	6.83	7.78	-0.95	1.5E-5	6.65	7.56	-0.91	3.9E-5
AT3G60140	DNZ (DARK INDUCIBLE 2), hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds	8.03	8.90	-0.87	5.9E-5	8.07	8.50	-0.77	1.8E-2	8.78	8.70	-0.82	1.91E-3
AT5G10480	PAS2 (PASTICINO 2), protein tyrosine phosphatase-like protein, putative (PAS2)	8.32	9.18	-0.87	6.1E-5	8.07	9.04	-0.97	6.91E-6	8.19	9.11	-0.92	2.8E-5
AT3G17210	FAZ2 (FATTY ACID DESATURASE 2), delta12-fatty acid dehydrogenase	10.75	11.61	-0.87	6.2E-5	10.69	11.77	-1.08	5.9E-8	10.72	11.69	-0.97	2.6E-6
AT1G52700	the class III iron binding, iron oxidase/iron oxidase/oxygen binding	8.65	9.65	-0.86	6.3E-6	9.17	10.17	-0.77	0.0E+0	9.17	10.17	-0.77	0.0E+0
AT1G26450	ALDH8F1, aldehyde dehydrogenase oxidoreductase	7.13	8.07	-0.92	6.1E-6	7.25	8.68	-1.51	8.6E-8	7.15	8.36	-1.21	1.0E+0
AT1G19660	WRKY14, transcription factor	7.18	8.08	-0.90	1.3E-5	7.09	7.91	-0.74	1.49E-2	7.09	7.91	-0.82	1.3E-3
AT2G25490	EBF1 (EIN3-BINDING F-BOX PROTEIN 1), ubiquitin-protein ligase, F-box family protein	9.59	10.47	-0.88	3.8E-5	10.28	10.17	0.11	1.0E+0	9.93	10.32	-0.39	1.0E+0
AT4G23190	CRK11 (CYSTEINE-RICH RLK11), kinase, protein kinase family protein	6.99	7.86	-0.87	4.9E-5	7.10	7.70	-0.59	7.7E-8	7.05	7.78	-0.73	3.1E-2
AT1G520375	CP11 (CYCLOPROPYL ISOMERASE), cyclopropyl isomerase (CPI1)	7.40	8.27	-0.87	5.7E-5	7.18	8.27	-1.08	4.0E-8	7.29	8.27	-0.98	2.14E-6
AT2G38940	ATP2 (PHOSPHATE TRANSPORTER 2), carboxylate transporter/phosphate transporter	6.47	7.33	-0.87	5.7E-5	6.83	7.78	-0.95	1.5E-5	6.65	7.56	-0.91	3.9E-5
AT3G60140	DNZ (DARK INDUCIBLE 2), hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds	8.03	8.90	-0.87	5.9E-5	8.07	8.50	-0.77	1.8E-2	8.78	8.70	-0.82	1.91E-3
AT5G10480	PAS2 (PASTICINO 2), protein tyrosine phosphatase-like protein, putative (PAS2)	8.32	9.18	-0.87	6.1E-5	8.07	9.04	-0.97	6.91E-6	8.19	9.11	-0.92	2.8E-5
AT3G17210	FAZ2 (FATTY ACID DESATURASE 2), delta12-fatty acid dehydrogenase	10.75	11.61	-0.87	6.2E-5	10.69	11.77	-1.08	5.9E-8	10.72	11.69	-0.97	2.6E-6
AT1G52700	the class III iron binding, iron oxidase/iron oxidase/oxygen binding	8.65	9.65	-0.86	6.3E-6	9.17	10.17	-0.77	0.0E+0	9.17	10.17	-0.77	0.0E+0
AT1G26450	ALDH8F1, aldehyde dehydrogenase oxidoreductase	7.13	8.07	-0.92	6.1E-6	7.25	8.68	-1.51	8.6E-8	7.15	8.36	-1.21	1.0E+0
AT1G19660	WRKY14, transcription factor	7.18	8.08	-0.90	1.3E-5	7.09	7.91	-0.74	1.49E-2	7.09	7.91	-0.82	1.3E-3
AT2G25490	EBF1 (EIN3-BINDING F-BOX PROTEIN 1), ubiquitin-protein ligase, F-box family protein	9.59	10.47	-0.88	3.8E-5	10.28	10.17	0.11	1.0E+0	9.93	10.32	-0.39	1.0E+0
AT4G23190	CRK11 (CYSTEINE-RICH RLK11), kinase, protein kinase family protein	6.99	7.86	-0.87	4.9E-5	7.10	7.70	-0.59	7.7E-8	7.05	7.78	-0.73	3.1E-2
AT1G520375	CP11 (CYCLOPROPYL ISOMERASE), cyclopropyl isomerase (CPI1)	7.40	8.27	-0.87	5.7E-5	7.18	8.27	-1.08	4.0E-8	7.29	8.27	-0.98	2.14E-6
AT2G38940	ATP2 (PHOSPHATE TRANSPORTER 2), carboxylate transporter/phosphate transporter	6.47	7.33	-0.87	5.7E-5	6.83	7.78	-0.95	1.5E-5	6.65	7.56	-0.91	3.9E-5
AT3G60140	DNZ (DARK INDUCIBLE 2), hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds	8.03	8.90	-0.87	5.9E-5	8.07	8.50	-0.77	1.8E-2	8.78	8.70	-0.82	1.91E-3
AT5G10480	PAS2 (PASTICINO 2), protein tyrosine phosphatase-like protein, putative (PAS2)	8.32	9.18	-0.87	6.1E-5	8.07	9.04	-0.97	6.91E-6	8.19	9.11	-0.92	2.8E-5
AT3G17210	FAZ2 (FATTY ACID DESATURASE 2), delta12-fatty acid dehydrogenase	10.75	11.61	-0.87	6.2E-5	10.69	11.77	-1.08	5.9E-8	10.72	11.69	-0.97	2.6E-6
AT1G52700	the class III iron binding, iron oxidase/iron oxidase/oxygen binding	8.65	9.65	-0.86	6.3E-6	9.17	10.17	-0.77	0.0E+0	9.17	10.17	-0.77	0.0E+0
AT1G26													

AT13G54503	ALDH2C4 (REDUCED EPIDERMAL FLUORESCENCE1);	6,72	7,43	-0,70	3,48E-2	6,77	7,28	-0,51	1,00E+0	6,75	7,35	-0,61	1,00E+0
AT13G55800	transcription factor_ zinc finger (CCH-type) family protein	9,33	10,03	-0,70	3,92E-2	8,84	9,54	-0,69	1,79E-1	9,09	9,78	-0,70	1,02E-1
AT11G77850	ARF17; transcription factor	7,00	7,70	-0,70	4,42E-2	7,40	8,12	-0,72	7,18E-2	7,20	7,91	-0,71	6,73E-2
AT11G79180	DNA binding / transcription factor	6,71	7,40	-0,69	5,69E-2	6,94	7,73	-0,79	7,55E-3	6,83	7,57	-0,74	2,48E-2
AT12G47190	MYB2; DNA binding / transcription factor	7,28	7,96	-0,68	6,74E-2	7,03	7,72	-0,70	1,69E-1	7,15	7,84	-0,69	1,28E-1
AT13G48280	CYP71A25; heme binding / iron ion binding / monoxygenase/ oxygen binding	6,29	6,97	-0,68	7,28E-2	6,55	6,60	-0,05	1,00E+0	6,42	6,79	-0,37	1,00E+0
AT13G54820	PIP2;PIP2D; water channel_ aquaporin, putative	7,16	7,84	-0,67	1,05E-1	7,03	7,98	-0,95	1,77E-5	7,10	7,91	-0,81	2,01E-3
AT14G15760	oxidoreductase_ monoxygenase, putative	9,04	9,04	0,56	1,00E+0	10,01	8,68	1,33	0,00E+0	9,81	8,86	0,94	8,32E-6
AT14G29100	transcription factor_ ethylene-responsive family protein	10,61	10,05	0,56	1,00E+0	12,07	11,09	0,98	4,44E-6	11,34	10,57	0,77	8,53E-3
AT11G57720	translational elongation factor_ elongation factor 1B-gamma, putative	8,97	8,39	0,59	1,00E+0	10,06	8,13	1,94	0,00E+0	9,52	9,26	0,26	0,00E+0
AT12G03800	GEK1 (GEK01)	8,13	7,53	0,59	1,00E+0	9,23	8,02	1,21	6,17E-11	8,68	7,78	0,90	5,12E-5
AT12G03900	FUS1 (FUSCA1); MAP kinase kinase_ COP9 signalosome complex subunit 7ii	8,60	7,95	0,65	2,18E-1	9,05	8,27	0,79	8,08E-3	8,83	8,11	0,72	4,99E-2
AT11G54140	TAF121 (TAF1A BINDING PROTEIN ASSOCIATED FACTOR 21KDA SUBUNIT);	9,63	9,08	0,75	7,20E-3	9,90	9,13	0,77	1,68E-2	9,86	9,11	0,76	1,34E-2
AT13G50970	MNP (MONOPOLE); transcription factor_ zinc finger (GATA type) family protein	8,48	8,63	0,82	4,98E-4	8,76	8,28	0,48	1,00E+0	8,61	7,96	0,65	4,92E-1
AT13G70640	OBP2; DNA binding_ Dof-type zinc finger domain-containing protein	7,59	6,75	0,84	1,88E-4	7,53	6,78	0,75	3,28E-2	7,96	6,77	0,79	3,63E-3
AT13G11260	WOX5; transcription factor_ homeobox-leucine zipper transcription factor family protein	11,06	10,01	1,05	8,99E-9	10,90	10,38	0,52	1,00E+0	10,98	10,20	0,79	4,77E-3
AT11G01470	LEA14 (LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT 14)	9,16	9,16	1,19	7,70E-12	10,08	9,68	0,40	0,00E+0	10,22	9,92	0,29	0,00E+0
AT11G01080	ATERF10/ERF10	9,30	7,88	1,42	0,00E+0	8,98	7,83	1,14	2,17E-9	9,14	7,86	1,28	0,00E+0
AT11G03800	LEC1 (LEAFY COTYLEDON 1); CCAAT-box binding transcription factor	10,22	7,64	2,58	0,00E+0	9,47	7,70	1,77	0,00E+0	9,84	7,67	2,17	0,00E+0
AT11G21970	Green Fluorescent Protein	10,44	6,66	3,58	0,00E+0	10,25	7,37	2,88	0,00E+0	10,35	7,12	3,23	0,00E+0



A02947485	unknown protein_ F-box family protein	-0.68	3.68E-3	-1.04	7.69E-12	-0.86	6.37E-7	-1.49	0.00E+0	-1.54	0.00E+0	-1.52	0.00E+0	-0.98	1.18E-9
AT1G48780	protein phosphatase type 2A regulator/ signal transducer_ WD-40 repeat family protein	-0.63	2.95E-2	-1.06	0.00E+0	-0.85	1.37E-6	-1.59	0.00E+0	-1.13	3.81E-9	-1.36	0.00E+0	-0.93	2.14E-8
A0548175	unknown protein_ SET domain-containing protein	-0.69	3.38E-3	-0.97	6.92E-10	-0.83	4.04E-6	-0.76	1.08E-3	-1.14	2.34E-9	-0.95	6.49E-6	-0.84	9.43E-9
AT1G74500	DNA binding / transcription factor_ bHLH family protein	-0.70	1.74E-3	-0.90	3.02E-8	-0.80	1.37E-5	-1.14	4.50E-3	-1.01	9.42E-7	-1.07	2.01E-8	-0.98	0.00E+0
AT1G69710	regulator of chromosome condensation (RCC1) family protein	-0.65	3.42E-1	-0.92	1.51E-8	-0.78	3.68E-5	-1.92	0.00E+0	-1.64	0.00E+0	-1.78	0.00E+0	-0.70	1.80E-3
A032390	unknown protein_ SET domain-containing protein	-0.60	9.77E-2	-0.93	7.71E-9	-0.77	8.62E-5	-0.16	1.00E+0	-1.04	3.53E-7	-0.49	1.00E+0	-1.21	0.00E+0
AT1G26780	unknown protein_ SET domain-containing protein	-0.71	1.01E-3	-0.80	7.01E-6	-0.76	1.15E-4	-0.81	5.45E-4	-1.07	6.82E-8	-0.51	1.00E+0	-1.67	0.00E+0
Nogene	adenine phosphoribosyltransferase_ adenine phosphoribosyltransferase, putative	-0.91	6.10E-8	-0.60	8.55E-2	-0.75	1.65E-4	-0.72	1.90E-2	-1.48	0.00E+0	-1.10	5.40E-9	-1.04	1.54E-11
AT1G03230	DRM1 (DORMANCY-ASSOCIATED PROTEIN 1)	-0.49	1.00E+0	-0.86	9.76E-10	-0.72	5.88E-4	-0.93	3.02E-6	-1.11	9.83E-9	-1.02	2.43E-7	-0.87	5.79E-7
AT5G11160	protein binding / signal transducer_ phototropic-responsive NPH3 family protein	-0.72	9.35E-4	-0.71	6.35E-4	-0.71	9.28E-4	-1.49	0.00E+0	-1.10	1.54E-8	-1.29	0.00E+0	-0.73	4.44E-4
AT1G23330	ABC transporter family protein	-0.67	7.28E-3	-0.76	8.06E-5	-0.71	1.01E-3	-0.93	3.57E-6	-1.34	0.00E+0	-1.14	8.48E-10	-0.67	5.42E-3
AT5G48130	S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase	-0.82	5.30E-6	-0.59	1.13E-1	-0.71	1.28E-3	-1.18	7.70E-12	-1.71	0.00E+0	-1.44	0.00E+0	-1.25	0.00E+0
A041190	ADST1 (DELTA 9 DESATURASE 1)	-0.55	6.38E-1	-0.85	6.01E-7	-0.70	1.63E-3	-0.81	5.40E-4	-0.77	1.44E-2	-0.79	3.76E-3	-0.64	2.75E-2
A0349810	RC12A (RARE-COLD-INDUCIBLE 2A)	-0.52	1.00E+0	-0.81	6.06E-6	-0.66	8.33E-3	-0.79	1.48E-3	-0.95	1.76E-5	-0.87	2.08E-4	-0.93	1.74E-8
AT1G31770	unknown protein_ integral membrane family protein	-0.64	1.98E-2	-0.59	9.29E-2	-0.62	4.92E-2	-0.65	2.20E-1	-0.92	5.07E-5	-0.79	4.84E-3	-0.68	5.11E-3
AT1G06080	unknown protein_ SET domain-containing protein	0.53	1.00E+0	0.95	1.59E-9	0.74	2.46E-4	-0.64	2.78E-1	0.85	6.98E-4	0.11	1.00E+0	0.79	2.46E-5
AT3G05880	unknown protein_ SET domain-containing protein	1.49	0.00E+0	1.09	0.00E+0	1.29	0.00E+0	1.02	5.37E-8	1.11	1.15E-8	1.06	3.55E-8	0.88	2.66E-7
A1G52827	unknown protein_ SET domain-containing protein	-0.64	2.10E-2	-0.57	2.33E-1	-0.61	8.13E-2	-2.34	0.00E+0	-2.89	0.00E+0	-2.61	0.00E+0	-0.84	2.49E-2
AT3E01742	unknown protein_ SET domain-containing protein	-0.44	1.00E+0	-0.62	2.82E-2	-0.53	1.00E+0	-2.02	0.00E+0	-2.60	0.00E+0	-2.31	0.00E+0	-1.72	0.00E+0
A02915220	unknown protein	-0.46	1.00E+0	-0.70	1.06E-3	-0.58	2.11E-1	-2.03	0.00E+0	-2.32	0.00E+0	-2.17	0.00E+0	-0.98	8.32E-10
AT1G70550	unknown protein	-0.25	1.00E+0	-0.98	4.07E-10	-0.61	6.07E-2	-2.00	0.00E+0	-2.32	0.00E+0	-2.16	0.00E+0	-1.49	0.00E+0
AT4G27657	unknown protein	-0.42	1.00E+0	-0.74	1.66E-4	-0.58	2.25E-1	-1.99	0.00E+0	-2.29	0.00E+0	-2.14	0.00E+0	-1.17	0.00E+0
A0507000	ATSEN1 (SPlicing ENDONUCLEASE 1); RNA-intron endonuclease	-0.63	3.07E-2	-0.26	1.00E+0	-0.45	1.00E+0	-2.02	0.00E+0	-1.79	0.00E+0	-1.91	0.00E+0	-1.63	0.00E+0
AT3E02448	ROST1_HHH-GPD base excision DNA repair family protein (ROST1)	-0.26	1.00E+0	-0.85	7.03E-7	-0.55	5.55E-1	-1.40	0.00E+0	-1.35	0.00E+0	-1.37	0.00E+0	-0.70	1.75E-3
AT3G45590	transcription factor	-0.48	1.00E+0	-0.61	3.99E-2	-0.55	7.35E-1	-0.96	1.12E-6	-1.43	0.00E+0	-1.19	4.62E-11	-1.17	0.00E+0
AT2G36490	unknown protein_ pseudogene, similar to unnamed protein product	-0.31	1.00E+0	-0.67	4.51E-3	-0.49	1.00E+0	-1.13	1.62E-10	-1.13	3.44E-9	-1.13	1.22E-9	-0.64	2.07E-2
AT2G43060	unknown protein_ SET domain-containing protein	-0.48	1.00E+0	-0.74	1.81E-4	-0.61	7.21E-2	-0.61	8.58E-1	-1.65	0.00E+0	-1.13	1.40E-9	-0.59	0.00E+0
A0505890	unknown protein_ SET domain-containing protein	-0.08	1.00E+0	-0.70	1.21E-3	-0.39	1.00E+0	-0.93	3.11E-6	-1.24	1.54E-11	-1.09	1.13E-8	-1.20	0.00E+0
AT3G23450	unknown protein_ SET domain-containing protein	-0.36	1.00E+0	-0.62	3.42E-2	-0.49	1.00E+0	-0.65	2.12E-1	-1.42	0.00E+0	-1.04	1.32E-7	-0.63	3.95E-2
A0506990	unknown protein_ SET domain-containing protein	-0.39	1.34E-2	-0.82	0.00E+0	-0.60	8.97E-2	-0.86	8.15E-5	-1.07	6.11E-8	-0.97	3.17E-6	-0.83	3.54E-6
		-0.65		-0.37	1.00E+0	-0.51	1.00E+0	-0.97	6.97E-7	-0.96	1.01E-5	-0.96	3.82E-6	-0.65	1.30E-2
		-0.38		-0.75	1.30E-4	-0.56	3.67E-1	-0.49	1.00E+0	-1.42	0.00E+0	-0.95	5.57E-6	-1.44	0.00E+0
		-0.26		-0.90	2.93E-8	-0.58	2.15E-1	-0.77	2.86E-3	-0.82	3.03E-3	-0.79	3.63E-3	-1.20	0.00E+0

## Literaturverzeichnis

- Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., Ichinoki, H., Notaguchi, M., Goto, K., and Araki, T.** (2005). FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* **309**, 1052-1056.
- Abel, S., and Theologis, A.** (1996). Early genes and auxin action. *Plant Physiol* **111**, 9-17.
- Agius, F., Kapoor, A., and Zhu, J.K.** (2006). Role of the Arabidopsis DNA glycosylase/lyase ROS1 in active DNA demethylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 11796-11801.
- Aida, M., Ishida, T., and Tasaka, M.** (1999). Shoot apical meristem and cotyledon formation during Arabidopsis embryogenesis: interaction among the CUP-SHAPED COTYLEDON and SHOOT MERISTEMLESS genes. *Development* **126**, 1563-1570.
- Aida, M., Vernoux, X., Furutani, M., Traas, M., and Tasaka, M.** (2002). Roles of PIN-FORMED1 and MONOPTEROS in pattern formation of the apical region of the Arabidopsis embryo (vol 129, pg 3965, 2002). *Development* **129**, 4877-4877.
- Alexander, I.** (1952). Entwicklungsstudien an Blüten von Cruciferen und Paperveraceen. *Planta*, 125-144.
- Allen, M.D., Yamasaki, K., Ohme-Takagi, M., Tateno, M., and Suzuki, M.** (1998). A novel mode of DNA recognition by a beta-sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA. *EMBO J* **17**, 5484-5496.
- Aloni, R., Aloni, E., Langhans, M., and Ullrich, C.I.** (2006). Role of auxin in regulating Arabidopsis flower development. *Planta* **223**, 315-328.
- Alvarez-Buylla, E.R., Ambrose, B.A., Flores-Sandoval, E., Vergara-Silva, F., Englund, M., Garay-Arroyo, A., Garcia-Ponce, B., de la Torre-Barcena, E., Espinosa-Matias, S., Martinez, E., Pineyro-Nelson, A., Engstrom, P., and Meyerowitz, E.M.** (2010). B-function expression in the flower center underlies the homeotic phenotype of *Lacandonia schismatica* (Triuridaceae). *Plant Cell* **22**, 3543-3559.
- Arber, A.** (1931). Studies in floral morphology. *New Phytol* **30**, 172-203.
- Bainbridge, K., Guyomarc'h, S., Bayer, E., Swarup, R., Bennett, M., Mandel, T., and Kuhlemeier, C.** (2008). Auxin influx carriers stabilize phyllotactic patterning. *Genes Dev* **22**, 810-823.
- Banno, H., Ikeda, Y., Niu, Q.W., and Chua, N.H.** (2001). Overexpression of Arabidopsis ESR1 induces initiation of shoot regeneration. *Plant Cell* **13**, 2609-2618.

- Banno H., M.H., Maekawa K.** (2006). Analysis of functional domains and binding sequences of Arabidopsis transcription factor ESR1. *Plant Biotechnology*, 303-308.
- Barton, M.K., and Poethig, R.S.** (1993). Formation of the Shoot Apical Meristem in Arabidopsis-Thaliana - an Analysis of Development in the Wild-Type and in the Shoot Meristemless Mutant. *Development* **119**, 823-831.
- Berleth, T., and Jurgens, G.** (1993). The role of the *monopteros* gene in organising the basal body region of the Arabidopsis embryo. *Development* **118**, 575.
- Bethke, G., Unthan, T., Uhrig, J.F., Poschl, Y., Gust, A.A., Scheel, D., and Lee, J.** (2009). Flg22 regulates the release of an ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in Arabidopsis thaliana via ethylene signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 8067-8072.
- Beveridge, C.A., Mathesius, U., Rose, R.J., and Gresshoff, P.M.** (2007). Common regulatory themes in meristem development and whole-plant homeostasis. *Curr Opin Plant Biol* **10**, 44-51.
- Binder, B.M., Walker, J.M., Gagne, J.M., Emborg, T.J., Hemmann, G., Bleecker, A.B., and Vierstra, R.D.** (2007). The Arabidopsis EIN3 binding F-box proteins EBF1 and EBF2 have distinct but overlapping roles in ethylene signaling. *Plant Cell* **19**, 509-523.
- Blackwood, E.M., and Eisenman, R.N.** (1991). Max - a Helix-Loop-Helix Zipper Protein That Forms a Sequence-Specific DNA-Binding Complex with Myc. *Science* **251**, 1211-1217.
- Blazquez, M.A., Soowal, L.N., Lee, I., and Weigel, D.** (1997). LEAFY expression and flower initiation in Arabidopsis. *Development* **124**, 3835-3844.
- Blodner, C., Goebel, C., Feussner, I., Gatz, C., and Polle, A.** (2007). Warm and cold parental reproductive environments affect seed properties, fitness, and cold responsiveness in Arabidopsis thaliana progenies. *Plant Cell Environ* **30**, 165-175.
- Bossinger, G., and Smyth, D.R.** (1996). Initiation patterns of flower and floral organ development in Arabidopsis thaliana. *Development* **122**, 1093-1102.
- Bowman, J.L., and Meyerowitz, E.M.** (1991). Genetic control of pattern formation during flower development in Arabidopsis. *Symp Soc Exp Biol* **45**, 89-115.
- Bowman, J.L., Smyth, D.R., and Meyerowitz, E.M.** (1989). Genes directing flower development in Arabidopsis. *Plant Cell* **1**, 37-52.
- Bowman, J.L., Smyth, D.R., and Meyerowitz, E.M.** (1991). Genetic interactions among floral homeotic genes of Arabidopsis. *Development* **112**, 1-20.
- Brand, U., Hobe, M., and Simon, R.** (2001). Functional domains in plant shoot meristems. *Bioessays* **23**, 134-141.
- Brand, U., Fletcher, J.C., Hobe, M., Meyerowitz, E.M., and Simon, R.** (2000). Dependence of stem cell fate in Arabidopsis on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science* **289**, 617-619.
- Breuil-Broyer, S., Morel, P., de Almeida-Engler, J., Coustham, V., Negrutiu, I., and Trehin, C.** (2004). High-resolution boundary analysis during Arabidopsis thaliana flower development. *Plant J* **38**, 182-192.

- Buratowski, S., and Chodosh, L.A.** (2001). Mobility Shift DNA-Binding Assay Using Gel Electrophoresis. (John Wiley & Sons, Inc.).
- Buttner, M., and Singh, K.B.** (1997). Arabidopsis thaliana ethylene-responsive element binding protein (AtEBP), an ethylene-inducible, GCC box DNA-binding protein interacts with an ocs element binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5961-5966.
- Byrne, M.E., Simorowski, J., and Martienssen, R.A.** (2002). ASYMMETRIC LEAVES1 reveals knox gene redundancy in Arabidopsis. *Development* **129**, 1957-1965.
- Byrne, M.E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J.M., Dunham, M., Hudson, A., and Martienssen, R.A.** (2000). Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in Arabidopsis. *Nature* **408**, 967-971.
- Callos, J.D., and Medford, J.I.** (1994). Organ Positions and Pattern-Formation in the Shoot Apex. *Plant Journal* **6**, 1-7.
- Chae, E., Tan, Q.K., Hill, T.A., and Irish, V.F.** (2008). An Arabidopsis F-box protein acts as a transcriptional co-factor to regulate floral development. *Development* **135**, 1235.
- Chandler, J.W., Cole, M., Flier, A., and Werr, W.** (2009). BIM1, a bHLH protein involved in brassinosteroid signalling, controls Arabidopsis embryonic patterning via interaction with DORNROSCHEN and DORNROSCHEN-LIKE. *Plant Mol Biol* **69**, 57-68.
- Chandler, J.W., Cole, M., Flier, A., Grewe, B., and Werr, W.** (2007). The AP2 transcription factors DORNROSCHEN and DORNROSCHEN-LIKE redundantly control Arabidopsis embryo patterning via interaction with PHAVOLUTA. *Development* **134**, 1653-1662.
- Chandler, J.W., Cole, M., Jacobs, B., Comelli, P., and Werr, W.** (2010). Genetic integration of DORNROSCHEN and DORNROSCHEN-LIKE reveals hierarchical interactions in auxin signalling and patterning of the Arabidopsis apical embryo. *Plant Mol Biol*.
- Charlier, N., Molenkamp, R., Leyssen, P., Vandamme, A.M., De Clercq, E., Bredenbeek, P., and Neyts, J.** (2003). A rapid and convenient variant of fusion-PCR to construct chimeric flaviviruses. *Journal of Virological Methods* **108**, 67-74.
- Cheong, Y.H., Moon, B.C., Kim, J.K., Kim, C.Y., Kim, M.C., Kim, I.H., Park, C.Y., Kim, J.C., Park, B.O., Koo, S.C., Yoon, H.W., Chung, W.S., Lim, C.O., Lee, S.Y., and Cho, M.J.** (2003). BWMK1, a rice mitogen-activated protein kinase, locates in the nucleus and mediates pathogenesis-related gene expression by activation of a transcription factor. *Plant Physiology* **132**, 1961-1972.
- Choe, S., Dilkes, B.P., Gregory, B.D., Ross, A.S., Yuan, H., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Tanaka, A., Yoshida, S., Tax, F.E., and Feldmann, K.A.** (1999). The Arabidopsis dwarf1 mutant is defective in the conversion of 24-methylenecholesterol to campesterol in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiology* **119**, 897-907.
- Choi, H.K., Choi, K.C., Kang, H.B., Kim, H.C., Lee, Y.H., Haam, S., Park, H.G., and Yoon, H.G.** (2008). Function of multiple Lis-Homology domain/WD-40

- repeat-containing proteins in feed-forward transcriptional repression by silencing mediator for retinoic and thyroid receptor/nuclear receptor corepressor complexes. *Mol Endocrinol* **22**, 1093-1104.
- Clark, S.E., Jacobsen, S.E., Levin, J.Z., and Meyerowitz, E.M.** (1996). The CLAVATA and SHOOT MERISTEMLESS loci competitively regulate meristem activity in Arabidopsis. *Development* **122**, 1567-1575.
- Coen, E.S., and Meyerowitz, E.M.** (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* **353**, 31-37.
- Cole, M., Chandler, J., Weijers, D., Jacobs, B., Comelli, P., and Werr, W.** (2009). DORNROSCHEN is a direct target of the auxin response factor MONOPTEROS in the Arabidopsis embryo. *Development* **136**, 1643-1651.
- Cutter, E.G.** (1965). Recent experimental studies of the shoot apex and shoot morphogenesis. *Bot. Rev.* **31**, 7-113.
- De Candolle, A.P.** (1821). Mémoire sur la famille de Crucifères. *Mém. Mus. Hist. Nat.*, 169-252.
- Despres, C., Subramaniam, R., Matton, D.P., and Brisson, N.** (1995). The Activation of the Potato Pr-Loa Gene Requires the Phosphorylation of the Nuclear Factor Pbf-1. *Plant Cell* **7**, 589-598.
- Elliott, R.C., Betzner, A.S., Huttner, E., Oakes, M.P., Tucker, W.Q., Gerentes, D., Perez, P., and Smyth, D.R.** (1996). AINTEGUMENTA, an APETALA2-like gene of Arabidopsis with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. *Plant Cell* **8**, 155-168.
- Endress, P.K.** (1992). Evolution and floral diversity: the phylogenetic surroundings of Arabidopsis and Antirrhinum. *Int.J. Plant Sci.*, 106-122.
- Endrizzi, K., Moussian, B., Haecker, A., Levin, J.Z., and Laux, T.** (1996). The SHOOT MERISTEMLESS gene is required for maintenance of undifferentiated cells in Arabidopsis shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes WUSCHEL and ZWILLE. *Plant J* **10**, 967-979.
- Feng, J.X., Liu, D., Pan, Y., Gong, W., Ma, L.G., Luo, J.C., Deng, X.W., and Zhu, Y.X.** (2005). An annotation update via cDNA sequence analysis and comprehensive profiling of developmental, hormonal or environmental responsiveness of the Arabidopsis AP2/EREBP transcription factor gene family. *Plant Mol Biol* **59**, 853-868.
- Fletcher, J.C.** (2002). Coordination of cell proliferation and cell fate decisions in the angiosperm shoot apical meristem. *Bioessays* **24**, 27-37.
- Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R., and Jurgens, G.** (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. *Nature* **426**, 147-153.
- Friml, J., Benkova, E., Blilou, I., Wisniewska, J., Hamann, T., Ljung, K., Woody, S., Sandberg, G., Scheres, B., Jurgens, G., and Palme, K.** (2002). AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in Arabidopsis. *Cell* **108**, 661-673.
- Friml, J., Yang, X., Michniewicz, M., Weijers, D., Quint, A., Tietz, O., Benjamins, R., Ouwerkerk, P.B., Ljung, K., Sandberg, G., Hooykaas, P.J., Palme, K.,**

- and Offringa, R.** (2004). A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux. *Science* **306**, 862-865.
- Fujimoto, S.Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H., and Ohme-Takagi, M.** (2000). Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell* **12**, 393-404.
- Galweiler, L., Guan, C., Muller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A., and Palme, K.** (1998). Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue. *Science* **282**, 2226-2230.
- Gonzali, S., Novi, G., Loreti, E., Paolicchi, F., Poggi, A., Alpi, A., and Perata, P.** (2005). A turanose-insensitive mutant suggests a role for WOX5 in auxin homeostasis in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **44**, 633-645.
- Gorter, C.J.** (1949). The influence of 2,3,5-triiodobenzoic acid on the growing points of tomatoes. *Proc. Kon. Ned. Akad. Wet.*, 1185-1193.
- Gorter, C.J.** (1951). The influence of 2,3,5-triiodobenzoic acid on the growing points of tomatoes. II. The initiation of ring fasciations. *Proc. Kon. Ned. Akad. Wet.*, 181-190.
- Grandjean, O., Vernoux, T., Laufs, P., Belcram, K., Mizukami, Y., and Traas, J.** (2004). *Plant Cell* **16**, 74.
- Guilfoyle, T.** (2007). Plant biology: sticking with auxin. *Nature* **446**, 621-622.
- Guilfoyle, T.J., and Hagen, G.** (2007). Auxin response factors. *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 453-460.
- Guilfoyle, T.J., Ulmasov, T., and Hagen, G.** (1998). The ARF family of transcription factors and their role in plant hormone-responsive transcription. *Cell Mol Life Sci* **54**, 619-627.
- Gustafson-Brown, C., Savidge, B., and Yanofsky, M.F.** (1994). Regulation of the arabidopsis floral homeotic gene APETALA1. *Cell* **76**, 131-143.
- Hagemann, W.** (1963). Die morphologische Sprossdifferenzierung und die Anordnung der Leitgewebes. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **76**, 131-120.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Hao, D., Ohme-Takagi, M., and Sarai, A.** (1998). Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of ethylene-responsive element-binding factor (ERF domain) in plant. *J Biol Chem* **273**, 26857-26861.
- Hao, D., Yamasaki, K., Sarai, A., and Ohme-Takagi, M.** (2002). Determinants in the sequence specific binding of two plant transcription factors, CBF1 and NtERF2, to the DRE and GCC motifs. *Biochemistry* **41**, 4202-4208.
- Hardtke, C.S., and Berleth, T.** (1998). The Arabidopsis gene MONOPTEROS encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO J* **17**, 1405-1411.
- Heisler, M.G., Ohno, C., Das, P., Sieber, P., Reddy, G.V., Long, J.A., and Meyerowitz, E.M.** (2005). Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the Arabidopsis inflorescence meristem. *Curr Biol* **15**, 1899-1911.

- Hempel, F.D., and Feldman, L.J.** (1995). Specification of chimeric flowering shoots in wild-type Arabidopsis. *Plant J* **8**, 725-731.
- Hepworth, S.R., Klenz, J.E., and Haughn, G.W.** (2006). UFO in the Arabidopsis inflorescence apex is required for floral-meristem identity and bract suppression. *Planta* **223**, 769-778.
- Hernandez, L.F., and Green, P.B.** (1993). Transductions for the Expression of Structural Pattern - Analysis in Sunflower. *Plant Cell* **5**, 1725-1738.
- Hicks, G.R., Smith, H.M., Shieh, M., and Raikhel, N.V.** (1995). Three classes of nuclear import signals bind to plant nuclei. *Plant Physiol* **107**, 1055-1058.
- Hill, J.P., and Lord, E.M.** (1989). Floral Development in Arabidopsis-Thaliana - a Comparison of the Wild-Type and the Homeotic Pistillata Mutant. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **67**, 2922-2936.
- Hurst, H.C.** (1994). Protein Profile: Transcription Factors 1: bZip Proteins. London: Academic Press.
- Ikeda, Y., Banno, H., Niu, Q.W., Howell, S.H., and Chua, N.H.** (2006). The ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 2 gene in Arabidopsis regulates CUP-SHAPED COTYLEDON 1 at the transcriptional level and controls cotyledon development. *Plant Cell Physiol* **47**, 1443-1456.
- Irish, V.a.S., I.** (1992). A fate map of the Arabidopsis embryonic shoot apical meris. *Development* **115**.
- Izhaki, A., and Bowman, J.L.** (2007). KANADI and class III HD-Zip gene families regulate embryo patterning and modulate auxin flow during embryogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**, 495-508.
- Jackson, R.G., Kowalczyk, M., Li, Y., Higgins, G., Ross, J., Sandberg, G., and Bowles, D.J.** (2002). Over-expression of an Arabidopsis gene encoding a glucosyltransferase of indole-3-acetic acid: phenotypic characterisation of transgenic lines. *The Plant Journal* **32**, 573-583.
- Jenik, P.D., and Irish, V.F.** (2000). Regulation of cell proliferation patterns by homeotic genes during Arabidopsis floral development. *Development* **127**, 1267-1276.
- Jofuku, K.D., den Boer, B.G., Van Montagu, M., and Okamoto, J.K.** (1994). Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene APETALA2. *Plant Cell* **6**, 1211-1225.
- Kagaya, Y., Ohmiya, K., and Hattori, T.** (1999). RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. *Nucleic Acids Res* **27**, 470-478.
- Kardailsky, I., Shukla, V.K., Ahn, J.H., Dagenais, N., Christensen, S.K., Nguyen, J.T., Chory, J., Harrison, M.J., and Weigel, D.** (1999). Activation tagging of the floral inducer FT. *Science* **286**, 1962-1965.
- Khan, S., and Stone, J.M.** (2007). Arabidopsis thaliana GH3.9 in Auxin and Jasmonate Cross Talk. *Plant Signal Behav* **2**, 483-485.
- Kiermayer, O.** (1960). Die Formative Wirksamkeit der 2,3,5-Trijodo- benzoessäure (TIBA) in Gegenwart von Gibberellinsäure (GA). *Planta*, 153-168.

- Kim, J., Harter, K., and Theologis, A.** (1997). Protein-protein interactions among the Aux/IAA proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11786-11791.
- Kirch, T., Simon, R., Grunewald, M., and Werr, W.** (2003). The DORNROSCHEN/ENHANCER OF SHOOT REGENERATION1 gene of Arabidopsis acts in the control of meristem cell fate and lateral organ development. *Plant Cell* **15**, 694-705.
- Koncz, I., Drexler, L., Glancz, J., and Tacsik, I.** (1986). [Experience in the management of vascular injuries]. *Magy Traumatol Orthop Helyreallito Seb* **29**, 23-31.
- Koornneef, M., Hanhart, C.J., and van der Veen, J.H.** (1991). A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in Arabidopsis thaliana. *Mol Gen Genet* **229**, 57-66.
- Koussevitzky, S., Nott, A., Mockler, T.C., Hong, F., Sachetto-Martins, G., Surpin, M., Lim, J., Mittler, R., and Chory, J.** (2007). Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science* **316**, 715-719.
- Krizek, B.A., and Fletcher, J.C.** (2005). Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 688.
- Krizek, B.A., Prost, V., and Macias, A.** (2000). AINTEGUMENTA promotes petal identity and acts as a negative regulator of AGAMOUS. *Plant Cell* **12**, 1357-1366.
- Kuhlemeier, C., and Reinhardt, D.** (2001). Auxin and phyllotaxis. *Trends Plant Sci* **6**, 187-189.
- Kwiatkowska, D.** (2006). Flower primordium formation at the Arabidopsis shoot apex: quantitative analysis of surface geometry and growth. *J Exp Bot* **57**, 571-580.
- Lamb, R.S., Hill, T.A., Tan, Q.K., and Irish, V.F.** (2002). Regulation of APETALA3 floral homeotic gene expression by meristem identity genes. *Development* **129**, 2079-2086.
- Laux, T., Mayer, K.F., Berger, J., and Jurgens, G.** (1996). The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in Arabidopsis. *Development* **122**, 87-96.
- Lawrence, G.H.** (1951). Taxonomy of flowering plants.
- Lenhard, M., and Laux, T.** (1999). Shoot meristem formation and maintenance. *Curr Opin Plant Biol* **2**, 44-50.
- Lenhard, M., Bohnert, A., Jurgens, G., and Laux, T.** (2001). Termination of stem cell maintenance in Arabidopsis floral meristems by interactions between WUSCHEL and AGAMOUS. *Cell* **105**, 805-814.
- Lestiboudois, T.** (1826). Memoire sur l'insertion des étamines des Crucifere. *ev.Trav.Soc.Amat.Sci.Lille* **1823/1824**, 243-247.
- Leyser, H.M., Pickett, F.B., Dharmasiri, S., and Estelle, M.** (1996). Mutations in the AXR3 gene of Arabidopsis result in altered auxin response including ectopic expression from the SAUR-AC1 promoter. *Plant J* **10**, 403-413.
- Leyser, O.** (2002). Molecular genetics of auxin signaling. *Annual Review of Plant Biology* **53**, 377-398.

- Li, J., Lease, K.A., Tax, F.E., and Walker, J.C.** (2001). BRS1, a serine carboxypeptidase, regulates BRI1 signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 5916-5921.
- Lin, R.C., Park, H.J., and Wang, H.Y.** (2008). Role of *Arabidopsis* RAP2.4 in regulating light- and ethylene-mediated developmental processes and drought stress tolerance. *Mol Plant* **1**, 42-57.
- Liu, C.M., Xu, Z.H., and Chua, N.H.** (1993). Auxin Polar Transport Is Essential for the Establishment of Bilateral Symmetry during Early Plant Embryogenesis. *Plant Cell* **5**, 621-630.
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K.** (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 1391-1406.
- Liu, Y., Zhao, T.-J., Liu, J.-M., Liu, W.-Q., Liu, Q., Yan, Y.-B., and Zhou, H.-M.** (2006). The conserved Ala37 in the ERF/AP2 domain is essential for binding with the DRE element and the GCC box. *FEBS letters* **580**, 1303-1308.
- Lohmann, J.U., Hong, R.L., Hobe, M., Busch, M.A., Parcy, F., Simon, R., and Weigel, D.** (2001). A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in *Arabidopsis*. *Cell* **105**, 793-803.
- Long, J., and Barton, M.K.** (2000). Initiation of axillary and floral meristems in *Arabidopsis*. *Dev Biol* **218**, 341-353.
- Long, J.A., Moan, E.I., Medford, J.I., and Barton, M.K.** (1996). A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the STM gene of *Arabidopsis*. *Nature* **379**, 66-69.
- Luschnig, C., Gaxiola, R.A., Grisafi, P., and Fink, G.R.** (1998). EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Development* **12**, 2175-2187.
- Lyndon, R.F.** (1998). *The Shoot Apical Meristem: Its Growth and Development*. Cambridge University Press.
- Maeo, K., Tokuda, T., Ayame, A., Mitsui, N., Kawai, T., Tsukagoshi, H., Ishiguro, S., and Nakamura, K.** (2009). An AP2-type transcription factor, WRINKLED1, of *Arabidopsis thaliana* binds to the AW-box sequence conserved among proximal upstream regions of genes involved in fatty acid synthesis. *Plant J* **60**, 476-487.
- Marsch-Martinez, N., Greco, R., Becker, J.D., Dixit, S., Bergervoet, J.H., Karaba, A., de Folter, S., and Pereira, A.** (2006). BOLITA, an *Arabidopsis* AP2/ERF-like transcription factor that affects cell expansion and proliferation/differentiation pathways. *Plant Mol Biol* **62**, 825-843.
- Matsumoto, N., and Okada, K.** (2001). A homeobox gene, PRESSED FLOWER, regulates lateral axis-dependent development of *Arabidopsis* flowers. *Genes Dev* **15**, 3355-3364.

- Matsuo, N., and Banno, H.** (2008). The Arabidopsis transcription factor ESR1 induces in vitro shoot regeneration through transcriptional activation. *Plant Physiol Biochem* **46**, 1045-1050.
- Mattsson, J., Ckurshumova, W., and Berleth, T.** (2003). Auxin signaling in Arabidopsis leaf vascular development. *Plant Physiology* **131**, 1327-1339.
- Mayer, K.F., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jurgens, G., and Laux, T.** (1998). Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. *Cell* **95**, 805-815.
- Medford, J.I.** (1992). Vegetative Apical Meristems. *Plant Cell* **4**, 1029-1039.
- Medford, J.I., Behringer, F.J., Callos, J.D., and Feldmann, K.A.** (1992). Normal and Abnormal Development in the Arabidopsis Vegetative Shoot Apex. *Plant Cell* **4**, 631-643.
- Merxmüller, H., and Leins, P.** (1967). Die Verwandtschaftsbeziehungen der Kreuzblütler und Mohngewächse. *Bot. Jahrb.Syst.* **86**, 113-129.
- Meyerowitz, E.M.** (1997). Genetic control of cell division patterns in developing plants. *Cell* **88**, 299-308.
- Miksche, J.P., Brown, J.A.M.** (1965). Development of vegetative and floral meristems of Arabidopsis thaliana. *Am. J. Bot.* **52**, 533-537.
- Mordhorst, A.P., Voerman, K.J., Hartog, M.V., Meijer, E.A., van Went, J., Koornneef, M., and de Vries, S.C.** (1998). Somatic embryogenesis in Arabidopsis thaliana is facilitated by mutations in genes repressing meristematic cell divisions. *Genetics* **149**, 549-563.
- Müller, A.** (1963). Zur Charakterisierung der Blüten und Infloreszenzen von Arabidopsis thaliana. *Heynh. Kulturpflanze* **9**, 364-393.
- Nag, A., Yang, Y., and Jack, T.** (2007). DORNROSCHEN-LIKE, an AP2 gene, is necessary for stamen emergence in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* **65**, 219-232.
- Nardmann, J., Ji, J., Werr, W., and Scanlon, M.J.** (2004). The maize duplicate genes narrow sheath1 and narrow sheath2 encode a conserved homeobox gene function in a lateral domain of shoot apical meristems. *Development* **131**, 2827-2839.
- Nawy, T., Bayer, M., Mravec, J., Friml, J., Birnbaum, K.D., and Lukowitz, W.** (2010). The GATA Factor HANABA TARANU Is Required to Position the Proembryo Boundary in the Early Arabidopsis Embryo. *Developmental Cell* **19**, 103-113.
- Néron, B., Ménager, H., Maufrais, C., Joly, N., Maupetit, J., Letort, S., Carrere, S., Tuffery, P., and Letondal, C.** (2009). Mobylye: a new full web bioinformatics framework. *Bioinformatics* **25**, 3005-3011.
- Ng, M., and Yanofsky, M.F.** (2001). Activation of the Arabidopsis B class homeotic genes by APETALA1. *Plant Cell* **13**, 739-753.
- Nole-Wilson, S., and Krizek, B.A.** (2000). DNA binding properties of the Arabidopsis floral development protein AINTEGUMENTA. *Nucleic Acids Res* **28**, 4076-4082.
- Nowak, M.A., Boerlijst, M.C., Cooke, J., and Smith, J.M.** (1997). Evolution of genetic redundancy. *Nature* **388**, 167-171.

- Ohme-Takagi, M., and Shinshi, H.** (1995). Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell* **7**, 173-182.
- Ohme-Takagi, M., Suzuki, K., and Shinshi, H.** (2000). Regulation of ethylene-induced transcription of defense genes. *Plant Cell Physiol* **41**, 1187-1192.
- Ohme-Takagi, M., Fujimoto S. Y., Ohta M., Usui, A. and Shinshi H. .** (2000). Arabidopsis Ethylene-Responsive Element Binding Factors Act as Transcriptional Activators or Repressors of GCC Box-Mediated Gene Expression. *plant cell* **12**, 393-405.
- Ohta, M., Ohme-Takagi, M., and Shinshi, H.** (2000). Three ethylene-responsive transcription factors in tobacco with distinct transactivation functions. *Plant J* **22**, 29-38.
- Ohta, M., Matsui, K., Hiratsu, K., Shinshi, H., and Ohme-Takagi, M.** (2001). Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *Plant Cell* **13**, 1959-1968.
- Okada, K., Ueda, J., Komaki, M.K., Bell, C.J., and Shimura, Y.** (1991). Requirement of the Auxin Polar Transport System in Early Stages of Arabidopsis Floral Bud Formation. *Plant Cell* **3**, 677-684.
- Okamoto, J.K., Caster, B., Villarroel, R., Van Montagu, M., and Jofuku, K.D.** (1997). The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7076-7081.
- Okushima, Y., Overvoorde, P.J., Arima, K., Alonso, J.M., Chan, A., Chang, C., Ecker, J.R., Hughes, B., Lui, A., Nguyen, D., Onodera, C., Quach, H., Smith, A., Yu, G., and Theologis, A.** (2005). Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in Arabidopsis thaliana: unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. *Plant Cell* **17**, 444-463.
- Ouellet, F., Overvoorde, P.J., and Theologis, A.** (2001). IAA17/AXR3: Biochemical insight into an auxin mutant phenotype. *Plant Cell* **13**, 829-841.
- Parcy, F., Nilsson, O., Busch, M.A., Lee, I., and Weigel, D.** (1998). A genetic framework for floral patterning. *Nature* **395**, 561-566.
- Pellerin, I., Schnabel, C., Catron, K.M., and Abate, C.** (1994). Hox Proteins Have Different Affinities for a Consensus DNA Site That Correlate with the Positions of Their Genes on the hox Cluster. *Molecular and Cellular Biology* **14**, 4532-4545.
- Phillips, T.A., VanBogelen, R.A., and Neidhardt, F.C.** (1984). lon gene product of Escherichia coli is a heat-shock protein. *J Bacteriol* **159**, 283-287.
- Pollock, R.M.** (2001). Determination of Protein-DNA Sequence Specificity by PCR-Assisted Binding-Site Selection. (John Wiley & Sons, Inc.).
- Przemeck, G.K., Mattsson, J., Hardtke, C.S., Sung, Z.R., and Berleth, T.** (1996). Studies on the role of the Arabidopsis gene MONOPTEROS in vascular development and plant cell axialization. *Planta* **200**, 229-237.
- Qin, G., Gu, H., Zhao, Y., Ma, Z., Shi, G., Yang, Y., Pichersky, E., Chen, H., Liu, M., Chen, Z., and Qu, L.J.** (2005). An indole-3-acetic acid carboxyl methyltransferase regulates Arabidopsis leaf development. *Plant Cell* **17**, 2693-2704.

- Rechsteiner, M., and Rogers, S.W.** (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends in Biochemical Sciences* **21**, 267-271.
- Reddy, G.V., Heisler, M.G., Ehrhardt, D.W., and Meyerowitz, E.M.** (2004). Real-time lineage analysis reveals oriented cell divisions associated with morphogenesis at the shoot apex of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **131**, 4225-4237.
- Reinhardt, D., Mandel, T., and Kuhlemeier, C.** (2000). Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell* **12**, 507-518.
- Reinhardt, D., Pesce, E.R., Stieger, P., Mandel, T., Baltensperger, K., Bennett, M., Traas, J., Friml, J., and Kuhlemeier, C.** (2003). Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* **426**, 255-260.
- Reinhardt, D.K., C.** (2002). *Meristematic Tissues in Plant Growth and Development*.
- Richards, F.J.** (1951). Phyllotaxis: Its Quantitative Expression and Relation to Growth in the Apex. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **235**, 509-564.
- Riechmann, J.L., and Meyerowitz, E.M.** (1998). The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biol Chem* **379**, 633-646.
- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghandehari, D., Sherman, B.K., and Yu, G.** (2000). *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* **290**, 2105-2110.
- Riggs, A.D., Suzuki, H., and Bourgeois, S.** (1970). lac repressor-operator interaction : I. Equilibrium studies. *Journal of Molecular Biology* **48**, 67-83.
- Rogers, S., Wells, R., and Rechsteiner, M.** (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* **234**, 364-368.
- Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P., and Scheres, B.** (1999). An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* **99**, 463-472.
- Sablowski, R.** (2007). Flowering and determinacy in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **58**, 899-907.
- Sachs, T.** (1991). *Pattern formation in plant tissues*. Cambridge University Press.
- Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J.G., Abe, H., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2002). DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* **290**, 998-1009.
- Sarkar, A.K., Luijten, M., Miyashima, S., Lenhard, M., Hashimoto, T., Nakajima, K., Scheres, B., Heidstra, R., and Laux, T.** (2007). Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* **446**, 811-814.
- Sasaki, K., Ito, H., Mitsuhashi, I., Hiraga, S., Seo, S., Matsui, H., and Ohashi, Y.** (2006). A novel wound-responsive cis-element, VWRE, of the vascular system-specific expression of a tobacco peroxidase gene, *tpoxN1*. *Plant Mol Biol* **62**, 753-768.

- Satina, S., Blakeslee, A. F., and Avery, A. .** (1940). Demonstration of three germ layers in the shoot apex of *Datura* by means of induced polyploidy in periclinal chimeras. *Am. J. Bot.*, 895-905.
- Sauders, E.R.** (1923). The bractless inflorescence of the Cruciferae. *New Phytol.* **22**, 150-156.
- Schlereth, A., Moller, B., Liu, W., Kientz, M., Flipse, J., Rademacher, E.H., Schmid, M., Jurgens, G., and Weijers, D.** (2010). MONOPTEROS controls embryonic root initiation by regulating a mobile transcription factor. *Nature* **464**, 913-916.
- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K.F., Jurgens, G., and Laux, T.** (2000). The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell* **100**, 635-644.
- Schwabe, W.W.** (1971). Chemical modification of phyllotaxis and its implications. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 354-400.
- Selker, J.M.L., Steucek, G.L., and Green, P.B.** (1992). Biophysical mechanisms for morphogenetic progressions at the shoot apex. *Development Biology* **153**, 29.
- Sessa, G., Morelli, G., and Ruberti, I.** (1993). The Athb-1 and Athb-2 Hd-Zip Domains Homodimerize Forming Complexes of Different DNA-Binding Specificities. *Embo Journal* **12**, 3507-3517.
- Singh, S., Cornilescu, C.C., Tyler, R.C., Cornilescu, G., Tonelli, M., Lee, M.S., and Markley, J.L.** (2005). Solution structure of a late embryogenesis abundant protein (LEA14) from *Arabidopsis thaliana*, a cellular stress-related protein. *Protein Sci* **14**, 2601-2609.
- Skirycz, A., Reichelt, M., Burow, M., Birkemeyer, C., Rolcik, J., Kopka, J., Zanon, M.I., Gershenzon, J., Strnad, M., Szopa, J., Mueller-Roeber, B., and Witt, I.** (2006). DOF transcription factor AtDof1.1 (OBP2) is part of a regulatory network controlling glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J* **47**, 10-24.
- Smith, H.M.S., Boschke, I., and Hake, S.** (2002). Selective interaction of plant homeodomain proteins mediates high DNA-binding affinity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 9579-9584.
- Smith, R.S., Guyomarc'h, S., Mandel, T., Reinhardt, D., Kuhlemeier, C., and Prusinkiewicz, P.** (2006). A plausible model of phyllotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 1301-1306.
- Smith, T.F., Gaitatzes, C., Saxena, K., and Neer, E.J.** (1999). The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends in Biochemical Sciences* **24**, 181-185.
- Smyth, D.R., Bowman, J.L., and Meyerowitz, E.M.** (1990). Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2**, 755-767.
- Snow, M., and Snow, R.** (1937). Auxin and leaf formation. *New Phytol.*, 1-18.
- Snow, M.a.S., R.** (1934). Experiments on Phyllotaxis Part III- Diagonal Splits through Decussate Apices. *Philos Trans R Soc Lond* **225**, 63-94.

- Snow, M.u.S., R.** (1931). Experiments on Phyllotaxis. *Philos Trans R Soc Lond B*, 1-43.
- Snow, M.u.S., R.** (1933). Experiments on phyllotaxis. II. The effect of displacing a primordium. *Philos Trans R Soc Lond*, 354-400.
- Staswick, P.E., Serban, B., Rowe, M., Tiryaki, I., Maldonado, M.T., Maldonado, M.C., and Suza, W.** (2005). Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell* **17**, 616-627.
- Steeves T.A. and Sussex, I.M.** (1989). *Patterns in Plant Development*. Cambridge University Press.
- Steinheil, A.** (1839). Considérations sur l'usage qu'on peut faire des rapports de position qui existent entre la bractée et les parties de chaque verticille floral, dans la détermination du plan normal sur lequel les différentes fleurs sont construites. *Ann. Sci. Nat. Sér.* **2**, 169-361.
- Stockinger, E.J., Gilmour, S.J., and Thomashow, M.F.** (1997). Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1035-1040.
- Sun, S., Yu, J.P., Chen, F., Zhao, T.J., Fang, X.H., Li, Y.Q., and Sui, S.F.** (2008). TINY, a dehydration-responsive element (DRE)-binding protein-like transcription factor connecting the DRE- and ethylene-responsive element-mediated signaling pathways in Arabidopsis. *J Biol Chem* **283**, 6261-6271.
- Sussex, I.M.** (1989). Developmental programming of the shoot meristem. *Cell* **56**, 225-229.
- Szewczyk, E., Nayak, T., Oakley, C.E., Edgerton, H., Xiong, Y., Taheri-Talesh, N., Osmani, S.A., and Oakley, B.R.** (2006). Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nature Protocols* **1**, 3111-3120.
- Takeda, S., Matsumoto, N., and Okada, K.** (2004). RABBIT EARS, encoding a SUPERMAN-like zinc finger protein, regulates petal development in Arabidopsis thaliana. *Development* **131**, 425.
- Tiwari, S.B., Wang, X.J., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J.** (2001). AUX/IAA proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin. *Plant Cell* **13**, 2809-2822.
- Tsukagoshi, H., Busch, W., and Benfey, P.N.** (2010). Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell* **143**, 606-616.
- Turing, A.M.** (1952). The chemical basis of morphogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B* **237**, 37.
- Uberlacker, B., Klinge, B., and Werr, W.** (1996). Ectopic expression of the maize homeobox genes ZmHox1a or ZmHox1b causes pleiotropic alterations in the vegetative and floral development of transgenic tobacco. *Plant Cell* **8**, 349-362.
- Ulmasov, T., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J.** (1997). ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science* **276**, 1865-1868.

- Ulmasov, T., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J.** (1999). Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *Plant J* **19**, 309-319.
- Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, S., and Shinozaki, K.** (1993). An Arabidopsis myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell* **5**, 1529-1539.
- van der Graaff, E., Dulk-Ras, A.D., Hooykaas, P.J., and Keller, B.** (2000). Activation tagging of the LEAFY PETIOLE gene affects leaf petiole development in Arabidopsis thaliana. *Development* **127**, 4971-4980.
- van der Voorn, L., and Ploegh, H.L.** (1992). The WD-40 repeat. *FEBS Lett* **307**, 131-134.
- Vaughan, J.G.** (1952). Structure of the angiosperm apex. *Nature* **169**, 458.
- Vaughan, J.G.** (1955). The morphology and growth of the vegetative and reproductive apices of Arabidopsis thaliana, Capsella bursa-pastoris and Anagallis arvensis. *Soc. Lond. Bot.* **55**, 279-301.
- Vidaurre, D.P., Ploense, S., Krogan, N.T., and Berleth, T.** (2007). AMP1 and MP antagonistically regulate embryo and meristem development in Arabidopsis. *Development* **134**, 2561-2567.
- Wagner, D., Sablowski, R.W., and Meyerowitz, E.M.** (1999). Transcriptional activation of APETALA1 by LEAFY. *Science* **285**, 582-584.
- Wagner, D., Wellmer, F., Dilks, K., William, D., Smith, M.R., Kumar, P.P., Riechmann, J.L., Greenland, A.J., and Meyerowitz, E.M.** (2004). Floral induction in tissue culture: a system for the analysis of LEAFY-dependent gene regulation. *Plant J* **39**, 273-282.
- Ward, J.M., Smith, A.M., Shah, P.K., Galanti, S.E., Yi, H., Demianski, A.J., van der Graaff, E., Keller, B., and Neff, M.M.** (2006). A new role for the Arabidopsis AP2 transcription factor, LEAFY PETIOLE, in gibberellin-induced germination is revealed by the misexpression of a homologous gene, SOB2/DRN-LIKE. *Plant Cell* **18**, 29-39.
- Wardlaw, C.W.** (1949). Experiments on organogenesis in ferns. *Growth* **13**, 93-131.
- Weigel, D.** (1995). The APETALA2 domain is related to a novel type of DNA binding domain. *Plant Cell* **7**, 388-389.
- Weigel, D., and Jurgens, G.** (2002). Stem cells that make stems. *Nature* **415**, 751-754.
- Weigel, D., Alvarez, J., Smyth, D.R., Yanofsky, M.F., and Meyerowitz, E.M.** (1992). LEAFY controls floral meristem identity in Arabidopsis. *Cell* **69**, 843-859.
- William, D.A., Su, Y., Smith, M.R., Lu, M., Baldwin, D.A., and Wagner, D.** (2004). Genomic identification of direct target genes of LEAFY. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1775-1780.
- Williams, R.F.** (1975). *Shoot Apex and Leaf Growth* London: Cambridge University Press.
- Wilson, K., Long, D., Swinburne, J., and Coupland, G.** (1996). A Dissociation insertion causes a semidominant mutation that increases expression of TINY, an Arabidopsis gene related to APETALA2. *Plant Cell* **8**, 659-671.

- Woodrick, R., Martin, P.R., Birman, I., and Pickett, F.B.** (2000). The Arabidopsis embryonic shoot fate map. *Development* **127**, 813-820.
- Xie, Q., Frugis, G., Colgan, D., and Chua, N.H.** (2000). Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Dev* **14**, 3024-3036.
- Yang, S., Wang, S., Liu, X., Yu, Y., Yue, L., Wang, X., and Hao, D.** (2009). Four divergent Arabidopsis ethylene-responsive element-binding factor domains bind to a target DNA motif with a universal CG step core recognition and different flanking bases preference. *FEBS J* **276**, 7177-7186.
- Yang, Z., Tian, L.N., Latoszek-Green, M., Brown, D., and Wu, K.Q.** (2005). Arabidopsis ERF4 is a transcriptional repressor capable of modulating ethylene and abscisic acid responses. *Plant Molecular Biology* **58**, 585-596.
- Yin, Y., Vafeados, D., Tao, Y., Yoshida, S., Asami, T., and Chory, J.** (2005). A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in Arabidopsis. *Cell* **120**, 249-259.
- Zarei, A., Korbes, A.P., Younessi, P., Montiel, G., Champion, A., and Memelink, J.** (2011). Two GCC boxes and AP2/ERF-domain transcription factor ORA59 in jasmonate/ethylene-mediated activation of the PDF1.2 promoter in Arabidopsis. *Plant Mol Biol*.
- Zhang, S., Yang, C., Peng, J., Sun, S., and Wang, X.** (2009). GASA5, a regulator of flowering time and stem growth in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol* **69**, 745-759.
- Zhao, T.J., Sun, S., Liu, Y., Liu, J.M., Liu, Q., Yan, Y.B., and Zhou, H.M.** (2006). Regulating the drought-responsive element (DRE)-mediated signaling pathway by synergic functions of trans-active and trans-inactive DRE binding factors in Brassica napus. *J Biol Chem* **281**, 10752-10759.
- Zimmerman, P.W., and Hitchcock, A.E.** (1937). Comparative effectiveness of acids, esters, and salts as growth substances and methods of evaluating them. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*  
, 321-343.

---

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln unter der Leitung von Prof. Dr. W. Werr angefertigt.

Prof. Dr. W Werr möchte ich für seine Betreuung und Diskussionsbereitschaft danken.

Prof Dr. S.Roth für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für Entwicklungsbiologie für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

.....

Name	Bianca Jacobs
Geburtsdatum	06. Januar 1979
Geburtsort	Duisburg
Familienstand	ledig

### Schulbildung

.....

1985-1989	Marienfeld-Grundschule, Duisburg
1989-1998	Albert-Einstein-Gymnasium, Duisburg, Abschluss: Abitur

### Studium

.....

1998-2006	Studiums Biologie an der Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf Abschluss als Diplom-Biologin
November 2006	Begin Promotion in Entwicklungsbiologie an der Universität zu Köln

---

Bianca Jacobs  
Subbelratherstraße 271  
50825 Köln

**Ehrenwörtliche Erklärung zu meiner Dissertation mit dem Titel: „Molekularbiologische Analyse von *Dornröschen* und *Dornröschen-like*“**

Sehr geehrte Damen und Herren,

hiermit erkläre ich, dass ich die beigefügte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift